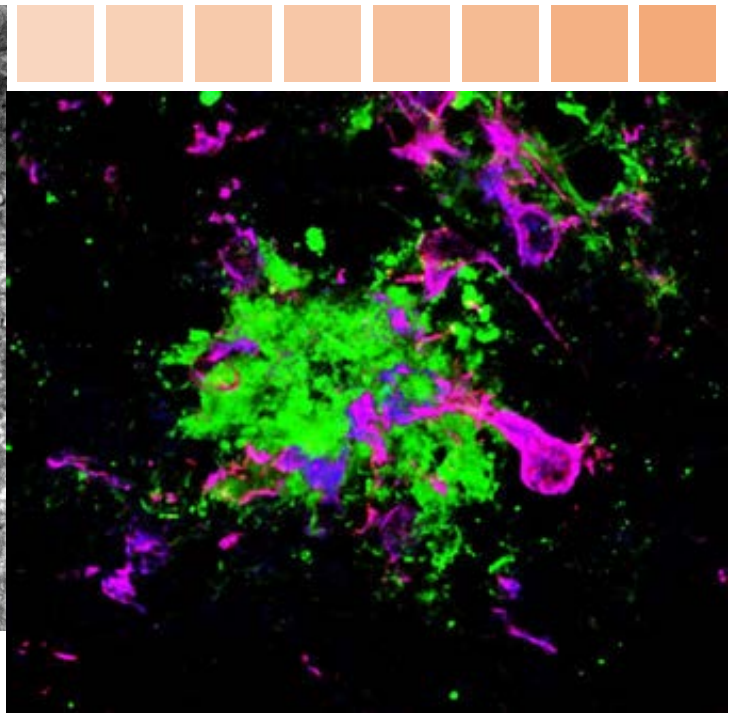
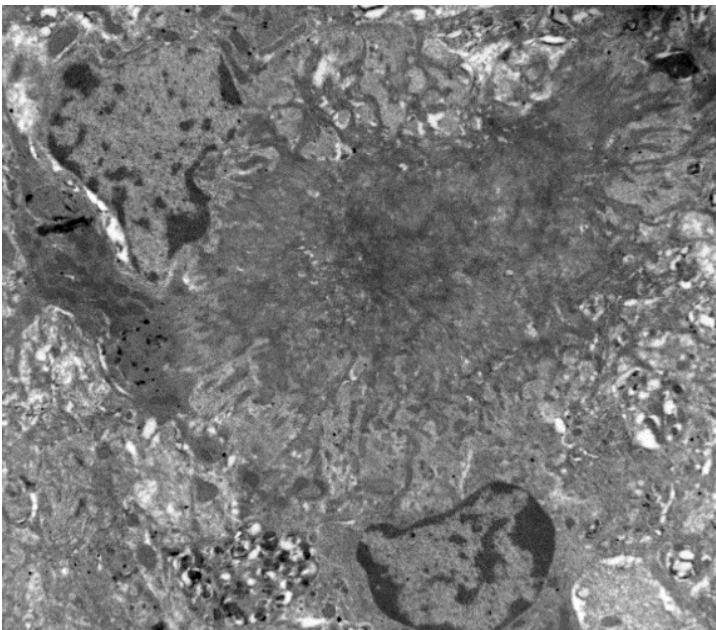




TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la patología amiloide y su
relación con la microglía en modelos
transgénicos de la enfermedad de Alzheimer**



Cristina Núñez Díaz

Facultad de Ciencias
Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología
Área de Biología Celular
Universidad de Málaga



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología

Área de Biología Celular, Facultad de Ciencias

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE Y SU RELACIÓN CON LA MICROGLÍA EN MODELOS TRANSGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Memoria presentada por la Licenciada Dña. Cristina Núñez Díaz
para Optar al Grado de Doctor por la Universidad de Málaga


Directores: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez y Dr. Javier Vitorica Ferrández

Málaga, 2019



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Cristina Núñez Díaz

 <http://orcid.org/0000-0003-2685-1340>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Dra. Dña. Antonia Gutiérrez Pérez, Catedrática del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

Dr. D. Francisco Javier Vitorica Ferrández, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN

Que Dña. Cristina Núñez Díaz, Licenciada en Biología y con DNI 74946233C, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “Caracterización de la patología amiloide y su relación con la microglía en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer”. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Málaga a 30 de Octubre de 2019.

Fdo.: Antonia Gutiérrez Pérez

Fdo.: Javier Vitorica Ferrández

El presente trabajo de Tesis Doctoral se ha financiado por los siguientes **proyectos de investigación**:

Oligómeros tóxicos del Abeta como agentes causantes de la disfunción del citoesqueleto y los procesos proteolíticos en la enfermedad de Alzheimer: búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. Ref. PI12/01431. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2013-2015.

Oligomerización y toxicidad de los péptidos de Abeta: búsqueda de nuevas dianas de interés terapéutico en la enfermedad de Alzheimer. Entidad financiera: Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia. Ref. PI12-CTS-2035. IP: Dr. Francisco Javier Vitorica Ferrández. Duración: 2014-2019.

Evaluando la disfunción microglial y astrogliar como parte del proceso neurodegenerativo y la demencia en la enfermedad de Alzheimer: nuevas aproximaciones terapéuticas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto coordinado. Ref. PI15/00796, IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez, y ref. PI15/00957, IP: Dr. Francisco Javier Vitorica Ferrández. Duración 2016-2018.

Descifrando la diversidad funcional de la respuesta microglial y astrogliar en la enfermedad de Alzheimer: potencial patológico y terapéutico. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto coordinado. Ref. PI18/01557, IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez, y ref. PI18/01556, IP: Dr. Francisco Javier Vitorica Ferrández. Duración 2019-2021.

Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Programa 1: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias degenerativas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación. IPs: Antonia Gutiérrez Pérez y Javier Vitorica Ferrández. 2007-Actualidad

Dña. Cristina Núñez Díaz, durante este tiempo ha disfrutado de un contrato de Investigación predoctoral con cargo al Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía PI12-CTS-2035.

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, se han publicado los siguientes artículos científicos en revistas internacionales y un capítulo de libro:

1. Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Díaz C, Trujillo-Estrada L, Davila JC, Vizuite M, Gutierrez A, Vitorica J. *Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration*. **Acta Neuropathologica** 2016, 132(6): 897-916. DOI: 10.1007/s00401-016-1630-5. Índice de impacto: 18,174.
2. Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Díaz C, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L, Fernandez-Valenzuela JJ, Vizuite M, Comella JX, Galea E, Vitorica J, Gutierrez A. *Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease*. **Glia** 2018, 66(3):637-653. DOI: 10.1002/glia.23270. Índice de impacto: 5,829.
3. Sanchez-Mejias E*, Nuñez-Díaz C*, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Davila JC, Vitorica J, Gutierrez A. Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients. **Brain Pathology** 2019, In Press. DOI: 10.1111/bpa.12785. Índice de impacto: 6,352.
*Ambos son primeros autores.
4. Baglietto-Vargas D, Cai L, Martini AC, Trujillo-Estrada L, Forner S, Swarup V, Thu Nguyen MM, Huynh KD, Jiang S, Kramár EA, Nuñez-Díaz C, Balderrama-Gutierrez G, Garcia F, Childs J, Rodriguez-Ortiz CJ, Kitazawa M, Shahnawaz M, Matheos DP, Ma X, Cunha CD, Walls KC, Ager RR, Soto C, Gutierrez A, Moreno-Gonzalez I, MacGregor GR, Green KN, Wood MA, Mortazavi A, Tenner AJ, LaFerla FM. *Humanized A β mice develop age-related impairments in LTP, cognition, and pathology: a basis to model late-onset Alzheimer's Disease*. **Nature Communications** 2019 (en segunda revisión). Índice de impacto: 11,88.
5. Nuñez-Díaz C, Vitorica J y Gutierrez A. Capítulo "Toxicidad de las placas amiloides y su impacto en la progresión de la enfermedad de Alzheimer". (2018). *Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and other Diseases*, pp. 195-207. UMA Editorial. ISBN 978-84-17449-55-1.

Aunque es difícil plasmarlo en papel, me gustaría agradecer a la gente que me ha ayudado y apoyado a lo largo de este camino, sin vosotros este trabajo no habría sido posible.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis, Antonia y Javier. Antonia, gracias por darme la oportunidad de pertenecer a este grupo, que es más bien una familia de la cual he aprendido muchísimo a lo largo de estos años. Eres una gran profesora e investigadora, muchísimas gracias por tu dedicación, por la pasión que tienes por tu trabajo y por estar siempre pendiente de todo. Javier, gracias por tu apoyo todos estos años y por aportar tu conocimiento y experiencia bioquímica, que han sido fundamentales para complementar este trabajo. Gracias, tanto a ti como a tu grupo de investigación, por acogerme tan bien cuando he ido a vuestro laboratorio.

Quiero agradecer también a dos personas que han aportado mucho en este trabajo de forma desinteresada. José Carlos, muchas gracias por tu ayuda y por transmitirme tus conocimientos de microscopía electrónica, he aprendido mucho de ti en las horas de electrónico. David, gracias por lo pendiente que estuviste de todo durante mi estancia en el laboratorio de Frank LaFerla, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias también por ayudarme en el procesamiento e interpretación de los resultados de la estancia. Quiero agradecer también a Frank LaFerla por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, así como a todo su grupo de investigación, fue una experiencia inolvidable.

Muchas gracias a mis compañeros de trabajo. Ángela, gracias por tu gran ayuda en la etapa final de la tesis y por enseñarme los secretillos de la microscopía electrónica. Mi compi de al lado en la sala de becarios, te voy a echar mucho de menos cuando te vayas a las Américas, pero pronto montaremos una colonia allí y nos iremos de fiestuki. Marina, muchas gracias por estar siempre dispuesta a ayudar con una sonrisa y por ser mi compi de fiesta, de salseo y *personal shopper*. Eli, muchísimas gracias por volcarte en ayudarme cuando me faltaban horas del día y también por los ratos de risas, patatas bravas y nuestras frases de Anabelmua. Mercedes, gracias por enseñarme a trabajar en el laboratorio cuando era alumna interna, te he echado de menos estos últimos meses y me alegro mucho de que estés tan bien con tu pequeño Pepe. Gracias a las cuatro, no podría tener más suerte de trabajar con amigas como vosotras. Raquel, gracias por tu ayuda con la tesis y por tus chistes frikis, porque sabemos que en el fondo me hacen gracia. Laura T. (Laurita), muchas gracias por todo lo que me enseñaste durante mi TFM y por acogerme en tu casa americana durante la estancia, por los viajes y las excursiones al Costco, me alegro mucho de que estés de vuelta. Inés, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, por hacerme compañía en la sala cuando nos quedábamos hasta tarde y por echarme una mano con tus conocimientos. Juanjo, Juan y Laura C., gracias también por vuestra ayuda en este trabajo. Quiero agradecer además a todo el personal del departamento de Biología Celular, en el cual me he sentido como en casa durante estos años.

Gracias a mis amigos, por apoyarme y ayudarme en este camino. Ester, gracias por estar ahí siempre a pesar de los kilómetros de distancia y por escuchar mis audios, yo sé que en el fondo te encantan. Fonti, Fortu y Maricarmen, gracias por tantos ratos juntos, casas rurales y tardes de juegos de mesa, sobre todo en la etapa final de la tesis esos momentos eran necesarios para no volverme loca (más aún). Gracias a mi azafata favorita, Ana, espero que cumplas tu promesa de llamarme doctora del brillibrilli. Fran, gracias por tu apoyo desde tierras catalanas y por las numerosas meriendas de gordos que montábamos para discutir sobre la vida. Gracias a mi compi de tesis, Ari, por entender perfectamente el proceso de locura/tesis, estoy segura de que vas a ser una superdoctora. Gian, gracias por tu apoyo en los momentos de estrés, por los entrenamientos y por los dulces. Gracias a mis compis poleras por las risas en clase, porque hacéis que los martes sean uno de los mejores días de la semana.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer también a mi familia. A los doctores de la familia, Alberto y Patri, gracias por vuestro apoyo y por darme el mejor regalo, mi peque Ángel. Gracias a mis padres, porque sin vosotros nada de esto habría sido posible, sois los que siempre están ahí para todo. Gracias por los tupperes, por recogerme cuando acababa de trabajar a las tantas y por mil cosas más. Esta tesis es en gran parte vuestra.

A mis padres

“Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma,
cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental”

Santiago Ramón y Cajal

3xTgAD: línea transgénica de ratones con mutaciones en APP, PS1 y Tau

AAC: angiopatía amiloide cerebral

ABCA7: ATPasa transportadora de fosfolípidos ABCA7

ACE: enzima convertidora de angiotensina (del inglés, *angiotensin-converting enzyme*)

ADDLs: ligandos difusibles derivados de beta-amiloide (del inglés, *amyloid-beta derived diffusible ligands*)

AICD: dominio intracelular de APP (del inglés, *amyloid precursor protein intracellular domain*)

APH1: proteína faríngea anterior defectuosa 1 (del inglés, *anterior pharynx defective 1*)

APOE: apolipoproteína E

APOJ: también denominada clusterina, apolipoproteína J

APP/PS1: línea transgénica de ratones con mutaciones en APP y PS1

APP: proteína precursora amiloide (del inglés, *amyloid precursor protein*)

ASC: proteína tipo gránulo asociada a apoptosis con un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (del inglés, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*; *CARD: caspase activation and recruitment domain*)

AXL: receptor tirosin-quinasa UFO

A β : beta-amiloide

BACE: Enzima procesadora de APP en el sitio beta (del inglés, *beta-site APP cleaving enzyme*)

BHE: barrera hematoencefálica

BIN1: proteína 1 de interacción con MYC dependiente de box (del inglés, *MYC box-dependent-interacting protein 1*)

BSA: albúmina sérica bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)

C1q: componente del complemento 1q

C3: componente del complemento 3

C4: componente del complemento 4

C83: fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos, también denominado α -CTF

C99: fragmento carboxilo terminal de 99 aminoácidos, también denominado β -CTF

CA: región del asta de Ammon, *cornu ammonis*, se subdivide en CA1, CA2, CA3 y CA4

cc: cuerpo calloso

CD33: antígeno de superficie de células mieloides CD33

CD68: cúmulo de diferenciación 68 (del inglés, *cluster of differentiation 68*)

CE: corteza entorrinal

CERAD: Consorcio para establecer un registro de la enfermedad de Alzheimer (del inglés, *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease*)

Clec7a: miembro A de la familia de dominio lectina tipo C (del inglés, *C-type lectin domain family member A*)

CLU: también denominada apolipoproteína J, clusterina

CR1: receptor del complemento tipo 1 (del inglés, *complement receptor 1*)

CR3: receptor del complemento tipo 3 (del inglés, *complement receptor 3*)

CR5: receptor del complemento tipo 5 (del inglés, *complement receptor 5*)

CSF1R: receptor del factor 1 estimulador de colonias (del inglés, *colony stimulating factor 1 receptor*)

CST7: gen que codifica para la cistatina-7

CX3CR1: receptor 1 de quimioquina CX3C (del inglés, *CX3C chemokine receptor 1*). También conocido como receptor de fractalquina

DAB: 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorhídrico

DAM: microglía asociada a enfermedad (del inglés, *disease-associated microglia*)

DAP10: proteína activadora de DNAX de 10 kDa (del inglés, *DNAX-activating protein of 10 kDa*). También denominada *haematopoietic cell signal transducer*

DAP12: proteína activadora de DNAX de 12 kDa (del inglés, *DNAX-activating protein of 12 kDa*). También denominada *haematopoietic cell signal transducer*

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico

EA: enfermedad de Alzheimer

EAAT2: transportador de aminoácidos excitadores (del inglés, *excitatory amino-acid transporter 2*)

ECE: enzima convertidora de endotelina

EPHA1: receptor 1 de efrina tipo A (del inglés, *Ephrin type-A receptor 1*)

FAD: Alzheimer familiar (del inglés, *familial Alzheimer's disease*)

FcR: receptor para fracciones constantes

g: capa granular del giro dentado

GABA: ácido gamma-aminobutírico

Gal3: galectina 3

GD: giro dentado

GFAP: proteína glial fibrilar ácida (del inglés, *glial fibrillar acidic protein*)

GSK-3 β : glucógeno sintasa quinasa 3 beta (del inglés, *glucogen synthase kinase 3 beta*)

GWAS: estudios de asociación del genoma completo (del inglés, *genome-wide association studies*)

h: hilio del giro dentado

H2-D1: antígeno de histocompatibilidad de clase I H-2, cadena alfa D-B (pertenece a la familia MHC I)

H2-L: antígeno de histocompatibilidad de clase I H-2, cadena alfa L-D (pertenece a la familia MHC I)

hAPP: proteína precursora amiloide humana

hA β -KI: línea de ratones transgénicos con el A β humano no mutado dentro del gen *APP* de ratón

HLA-DRB1: antígeno leucocitario humano de clase II DR, cadena beta 1 (del inglés, *human leukocyte antigen class II DR Beta 1 chain*)

HLA-DRB5: antígeno leucocitario humano de clase II DR, cadena beta 5 (del inglés, *human leukocyte antigen class II DR Beta 5 chain*)

HMG-CoA: Hidroximetil glutaril coenzima A

HR-MAS RMN: espectroscopía de protones por resonancia magnética de alta resolución en ángulo mágico (del inglés, *High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*)

hTau: proteína Tau humana

Iba1: molécula adaptadora de unión a iones de calcio (del inglés, *Ionized calcium binding adapter molecule*)

IDE: enzima degradadora de insulina (del inglés, *insuline degrading enzyme*)

IFN α : interferón alfa

IFN β : interferón beta

IFN γ : interferón gamma

IGF1: factor de crecimiento de tipo insulina (del inglés, *insulin-like growth factor*)

IgG: inmunoglobulina G

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

INPP5D: inositol polifosfato-5-fosfatasa

LAMP: proteína asociada a la membrana de los lisosomas/endosomas (del inglés, *lysosomal-associated membrane protein*)

LATE: encefalopatía de TDP-43 predominante límbica relacionada con la edad (del inglés, *limbic predominant age-related TDP43 encephalopathy*)

LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad (del inglés, *low-density lipoprotein receptor*)

LGALS3: gen que codifica para la galectina 3

LOAD: Alzheimer de inicio tardío (del inglés, *late onset Alzheimer's disease*)

LRP1: Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (del inglés, *low density lipoprotein receptor-related protein 1*)

LRP6: Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 6 (del inglés, *low density lipoprotein receptor-related protein 6*)

LTP: potenciación a largo plazo (del inglés, *long term potentiation*)

m: estrato molecular (*stratum moleculare*) del giro dentado

MAPT: proteína asociada a microtúbulos Tau (del inglés, *microtubule-associated protein tau*)

MET: microscopía electrónica de transmisión

MMP2: metaloproteínasa de la matriz 2

MMP9: metaloproteínasa de la matriz 9

mol: capa molecular del subículo

Nct: nicastrina

NEP: neprilisina

NFTs: ovillos neurofibrilares (del inglés, *neurofibrillary tangles*)

NGF: factor de crecimiento nervioso (del inglés, *neural growth factor*)

Ni: níquel

Olig2: factor de transcripción 2 de oligodendrocitos

P2RY12: receptor purinérgico Y12 (del inglés, *purinergic receptor Y12*)

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*)

PBS: tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate-buffered saline*)

Pen2: potenciador de presenilina 2 (del inglés, *presenilin enhancer 2*)

PET: tomografía de emisión de positrones (del inglés, *positron emission tomography*)

PHF: filamentos pareados helicoidales (del inglés, *paired helical filaments*)

PICALM: proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidil-inositol (del inglés, *phosphatidyl inositol-binding clathrin assembly protein*)

pir: capa piramidal del subículo

pol: capa polimórfica del subículo

PrP: proteína priónica, denominada PrP^C en su conformación normal, y PrP^{Sc} en su conformación patológica

PS1: presenilina 1

PS2: presenilina 2

RER: retículo endoplasmático rugoso

SAD: Alzheimer esporádico (del inglés, *sporadic Alzheimer's disease*)

sAPP α : fragmento APP α soluble

sAPP β : APP β soluble

slm: estrato lacunoso-molecular (*stratum lacunosum-moleculare*) de CA1

SNC: sistema nervioso central

so: estrato oriens (*stratum oriens*) de CA1

sp: estrato piramidal (*stratum pyramidale*) de CA1

SPP1: gen que codifica la proteína osteopontina

sr: estrato radiado (*stratum radiatum*) de CA1

SR: receptores *scavenger*

Sub: subículo

TioS: Tioflavina-S

TLR: receptor de tipo Toll (del inglés, *toll-like receptor*)

TMEM119: proteína transmembrana 119 (del inglés, *transmembrane protein 119*)

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *tumor necrosis factor alfa*)

TREM2: receptor de disparo expresado en células mieloides 2 (del inglés, *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*)

Tx-100: Tritón X-100

TYROBP: proteína de unión a la tirosina quinasa TYRO (del inglés, *TYRO protein tyrosine kinase-binding protein*)

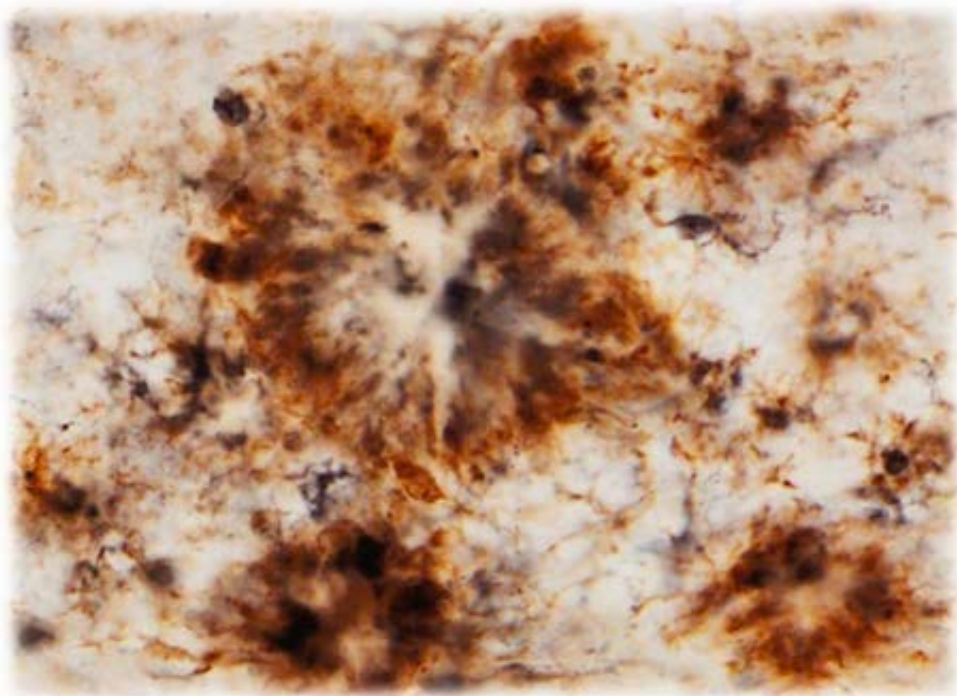
VLDLR: receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés, *very low-density lipoprotein receptor*)

WT: Genotipo silvestre (del inglés, *wild-type*)

α -CTF: fragmento carboxilo terminal alfa de 83 aminoácidos, también denominado C83 (del inglés, *carboxi-terminal fragment*)

β -CTF: fragmento carboxilo terminal beta de 99 aminoácidos, también denominado C99 (del inglés, *carboxi-terminal fragment*)

Índices



1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Enfermedad de Alzheimer. Características generales	3
1.1.1. Tipos de Alzheimer y factores de riesgo	4
1.1.2. Marcas histopatológicas de la enfermedad	7
1.1.3. Péptido beta-amiloide	8
1.1.4. Tau	13
1.1.5. Respuesta inflamatoria	14
1.1.6. Disfunción sináptica y muerte neuronal	20
1.2. Papel del Aβ y las placas amiloides en la patología	21
1.2.1. Hipótesis de la cascada amiloide e hipótesis alternativas	21
1.2.2. El péptido beta-amiloide y su eliminación	23
1.2.3. Agregación y propagación de A β	25
1.2.4. Oligómeros solubles y su toxicidad	26
1.2.5. Placas amiloides y su papel en la enfermedad de Alzheimer	27
1.3. Relación de la microglía con la patología amiloide	29
1.4. Modelos murinos para la enfermedad de Alzheimer	33
1.5. Planteamiento del trabajo y objetivos	35

2. MATERIAL Y MÉTODOS 39

2.1. Sujetos de estudio	41
2.1.1. Animales de experimentación	41
2.1.2. Muestras humanas <i>post mortem</i>	43
2.2. Procesamiento del tejido para microscopía óptica	44
2.2.1. Fijación y conservación del tejido de ratón	44
2.2.2. Obtención de cortes de cerebro de ratón	44
2.2.3. Delimitación anatómica de las regiones cerebrales de ratón	45
2.2.4. Procesamiento y obtención de cortes de tejido humano	46
2.3. Tinciones histológicas	47
2.3.1. Tioflavina-S	47
2.3.2. Rojo Congo	47
2.3.3. DAPI	47
2.3.4. Azul de toluidina	48

2.4. Inmunotinciones para microscopía óptica	48
2.4.1. Inmunohistoquímica simple para microscopía de campo claro	50
2.4.2. Inmunohistoquímica doble para microscopía de campo claro (DAB-NI/DAB)	53
2.4.3. Inmunofluorescencia múltiple para microscopía láser confocal	54
2.4.4. Controles para la inmunohistoquímica/inmunofluorescencia	55
2.5. Obtención de imágenes de microscopía óptica	56
2.5.1. Imágenes de microscopía de campo claro	56
2.5.2. Imágenes de microscopía de fluorescencia	56
2.5.3. Procesamiento de imágenes	56
2.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	57
2.6.1. Fijación, conservación y obtención de cortes	57
2.6.2. Postfijación, deshidratación e inclusión en resina	57
2.6.3. Montaje y tallado de las secciones incluidas en resina	58
2.6.4. Ultramicrotomía	58
2.6.5. Inmuno-oro para MET	58
2.6.6. Observación y obtención de imágenes de MET	60
2.7. Cuantificación mediante análisis de imagen	61
2.7.1. Análisis de la carga amiloide y la carga microglial	61
2.7.2. Número y tamaño de placas amiloides	61
2.7.3. Análisis de la carga microglial periplaca	63
2.7.4. Análisis del halo oligomérico de las placas amiloides	64
2.8. Cuantificación mediante estereología	64
2.8.1. Cuantificación estereológica de la densidad de neuritas distróficas asociadas al perímetro de las placas amiloides	67
2.8.2. Cuantificación estereológica de la carga amiloide en el hipocampo del modelo hA β -KI	68
2.9. Análisis metabolómico mediante HR-MAS RMN	69
2.10. Estudios bioquímicos y moleculares	71
2.10.1. Estudio transcriptómico de la microglía activa en ratones APP	71
2.10.2. Obtención de fracciones solubles	73
2.10.3. Ensayo de proteínas. Método de Bradford	74
2.10.4. Western Blot	74
2.10.5. Dot Blot	75

2.10.6. Ensayo de agregación	76
2.11. Estudios <i>In Vivo</i>	77
2.11.1. Inyecciones estereotáxicas intracerebrales	77
2.11.2. Pruebas conductuales	80
2.12. Análisis estadístico de los datos	81
2.13. Apéndice	82
2.13.1. Tampones para inmunohistoquímica	82
2.13.2. Tampones para western blot y dot blot	83
2.13.3. Solución fijadora (PLP)	83
2.13.4. Solución crioprotectora	83
2.13.5. Portaobjetos gelatinizados	84
2.13.6. Solución de revelado	84
2.13.7. Deshidratación y montaje	85
2.13.8. Medio de montaje para fluorescencia	85
2.13.9. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	85
2.13.10. Tinciones histológicas	86
2.13.11. Listado de reactivos	87

3. RESULTADOS 89

3.1. Análisis fenotípico de las placas amiloides durante la progresión de la patología	93
3.1.1. Evolución de la patología amiloide en el modelo APP/PS1	93
3.1.2. Análisis del halo oligomérico tóxico que rodea las placas amiloides	102
3.1.3. Análisis de la reactividad de la placa: inducción de neuritas distróficas	111
3.1.4. Análisis metabólico	118
3.2. Relación entre las placas amiloides y la microglía durante la progresión de la patología en el modelo APP/PS1	122
3.2.1. La respuesta microglial progresa en paralelo con la patología amiloide hasta los 12 meses, edad a partir de la cual existe un freno en la reactividad microglial	122
3.2.2. Caracterización transcriptómica de la microglía activada	134
3.2.3. La microglía periplaca presenta signos de actividad fagocítica	137

3.2.4. Evidencias ultraestructurales de la posible participación de la microglía en la formación de las placas amiloides	150
3.2.5. Microglía activada y agregación de las placas amiloides. Galectina 3 y ASC	155
3.2.6. La microglía activada TREM2-positiva rodea específicamente el core de las placas amiloides	167
3.2.7. El recubrimiento microglial de las placas amiloides disminuye con la progresión de la patología	171
3.2.8. La microglía periplaca presenta signos de degeneración	189
3.3. Estudio <i>in vivo</i> de la propagación de la patología amiloide	199
3.3.1. Las fracciones solubles derivadas de pacientes de Alzheimer y de ratones APP/PS1 aceleran la patología amiloide y la respuesta microglial <i>in vivo</i> en un modelo APP	199
3.3.2. Las fracciones solubles de pacientes de Alzheimer aceleran la patología amiloide en los modelos 3xTgAD y hA β -KI	216
4. DISCUSIÓN	231
4.1. Las placas amiloides aumentan en tamaño y toxicidad con la progresión de la patología en el modelo APP/PS1	234
4.2. Relación morfofuncional de la patología amiloide con la microglía activada. Cambios con la progresión de la enfermedad	238
4.2.1. El proceso de activación microglial se satura en fases avanzadas de la enfermedad a pesar del continuo aumento de la patología amiloide	239
4.2.2. La microglía activada se caracteriza por la expresión de la firma molecular “DAM”	241
4.2.3. La microglía periplaca exhibe diferentes fenotipos funcionales neuroprotectores: subtipos microgliales y cambios asociados a la patología	243
4.2.4. La microglía periplaca muestra signos de degeneración	252
4.3. El A β soluble de pacientes de Alzheimer y de modelos amiloidogénicos actúa como semilla y acelera la patología amiloide <i>in vivo</i>	257
5. CONCLUSIONES	263

6. SUMMARY 267

6.1. Abstract	271
6.2. Literature outline	273
6.2.1. Alzheimer's disease	273
6.2.2. A β and the amyloid cascade hypothesis	273
6.2.3. Amyloid plaques	274
6.2.4. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease	275
6.2.5. Aims of the study	276
6.3. Material and methods	278
6.3.1. Transgenic mice	278
6.3.2. Human samples	278
6.3.3. Region of study: Hippocampus	278
6.3.4. Tissue preparation	279
6.3.5. Thioflavin-S and congo red stainings	279
6.3.6. Light microscopy immunohistochemistry	279
6.3.7. Transmission electron microscopy (TEM)	280
6.3.8. Quantitative image analysis	281
6.3.9. Stereological analysis	281
6.3.10. Metabolites quantification	282
6.3.11. Transcriptomic profiling of activated microglia	282
6.3.12. <i>In vivo</i> A β seeding	282
6.3.13. Behavioral analysis	283
6.3.14. Statistical analysis	283
6.4. Results and Discussion	283
6.4.1. Phenotypic characterization of amyloid pathology in the hippocampus of APP/PS1 mice during the disease progression	283
6.4.2. Interaction between amyloid plaques and activated microglia in APP/PS1 hippocampus. Microglial subtypes and disease-dependent changes	285
6.4.3. <i>In vivo</i> analysis of A β seeding in familial and sporadic Alzheimer's disease models	287

7. BIBLIOGRAFÍA 291

8. ANEXOS (PUBLICACIONES)

311

Anexo 1. Sanchez-Mejias y col., 2019

Anexo 2. Gomez-Arboledas y col., 2017

Anexo 3. Sanchez-Mejias y col., 2016

Anexo 4. Nuñez-Diaz y col, 2018

1. INTRODUCCIÓN 1

Figura 1.1. Esquema comparativo de un hemisferio cerebral humano no patológico (izquierda) y otro afectado por la enfermedad de Alzheimer (derecha)	7
Figura 1.2. Secuencia de la proteína precursora amiloide	9
Figura 1.3. Vías canónicas de procesamiento de la proteína precursora amiloide	11
Figura 1.4. Sitios de corte de la γ -secretasa en el fragmento C99	12
Figura 1.5. Hiperfosforilación y agregación de Tau	14
Figura 1.6. Funciones clave de la microglía	16
Figura 1.7. Activación de la microglía DAM en enfermedades neurodegenerativas	17
Figura 1.8. Funciones fisiológicas de los astrocitos	19
Figura 1.9. Hipótesis de la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer	22
Figura 1.10. Hipótesis de la propagación de A β mediante semillas	26
Figura 1.11. Tipos de placas seniles	28

2. MATERIAL Y MÉTODOS 39

Figura 2.1. Esquema de las mutaciones sueca y londinense en la proteína precursora amiloide humana (hAPP) del modelo transgénico APP _{751SL}	41
Figura 2.2. Delimitación anatómica de la formación hipocampal en el cerebro de ratón	45
Figura 2.3. Delimitación anatómica del hipocampo y la corteza frontal en muestras humanas	46
Figura 2.4. Esquema de la inmunohistoquímica simple para campo claro	51
Figura 2.5. Esquema de la inmunofluorescencia triple	55
Figura 2.6. Esquema de la técnica inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión	60
Figura 2.7. Procedimiento para la cuantificación de la carga amiloide/glial mediante el programa Visilog 6.3 (Noesis)	61
Figura 2.8. Procedimiento para la cuantificación del número y tamaño de las placas amiloides mediante el software Imaris 7.2.3 (Bitplane Scientific Software)	62
Figura 2.9. Procedimiento para el cálculo de la carga glial periplaca mediante el programa Visilog 6.3 (Noesis)	63
Figura 2.10. Medición del área del halo periférico de las placas amiloides mediante el	64

programa Leica LAS AF lite

Figura 2.11. Imagen y esquema representativo de los componentes del sistema de análisis estereológico computerizado	65
Figura 2.12. ssf: Fracción muestreada de las secciones	66
Figura 2.13. asf: Fracción muestreada de área. Muestreo sistemático	66
Figura 2.14. hsf: Fracción muestreada de altura	66
Figura 2.15. Cuantificación del área de las placas mediante el nucleador	67
Figura 2.16. <i>Area Fraction Fractionator Probe</i>	69
Figura 2.17. Proceso de aislamiento de la microglía activa a partir del tejido de ratones APP de 3 y 12 meses de edad	72
Figura 2.18. Diseño experimental empleado para estudiar la capacidad tóxica de las fracciones solubles de pacientes y ratones APP/PS1 en el modelo amiloidogénico APP y en animales WT	78
Figura 2.19. Diseño experimental empleado para estudiar la capacidad tóxica de las fracciones solubles de pacientes en los modelos 3xTgAD y hA β -KI	79
Figura 2.20. Sitio de inyección estereotáxica en el hipocampo derecho de ratón	80
Figura 2.21. Prueba de campo abierto para la evaluación de la locomoción y el estrés	81
Tabla 2.1. Relación de animales APP/PS1 y WT empleados en los estudios inmunohistoquímicos para microscopía óptica y electrónica (Objetivos 1.1 y 2) y metabolómica (Objetivo 1.2)	42
Tabla 2.2. Relación de animales APP y WT inyectados en los experimentos <i>in vivo</i> realizados en la Universidad de Málaga (Objetivo 3.1)	43
Tabla 2.3. Relación de animales hA β -KI y 3xTgAD inyectados en los experimentos <i>in vivo</i> realizados en la Universidad de California, Irvine (Objetivo 3.2)	43
Tabla 2.4. Relación de las muestras humanas analizadas en el presente estudio	43
Tabla 2.5. Listado de marcadores estudiados mediante inmunohistoquímica y sus características	51
Tabla 2.6. Listado de anticuerpos primarios empleados para estudios inmunohistoquímicos	52
Tabla 2.7. Anticuerpos secundarios biotinilados empleados en inmunohistoquímica para microscopía a campo claro	53
Tabla 2.8. Listado de anticuerpos secundarios fluorescentes empleados en inmunofluorescencia	55

Tabla 2.9. Anticuerpos secundarios conjugados con oro empleados en inmunomarcaje para microscopía electrónica de transmisión	60
Tabla 2.10. Anticuerpos primarios empleados en <i>western blot</i>	75
Tabla 2.11. Anticuerpos primarios empleados en <i>dot blot</i>	75
Tabla 2.12. Anticuerpos secundarios empleados en <i>dot blot</i>	76

3. RESULTADOS 89

3.1. Análisis fenotípico de las placas amiloides durante la progresión de la patología

Figura 3.1. Progresión temporal de la patología amiloide en el hipocampo de ratones APP/PS1	95
Figura 3.2. El hipocampo de ratones APP/PS1 desarrolla placas fibrilares y compactas similares a las del hipocampo de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI)	96
Figura 3.3. Imágenes representativas de placas amiloides visualizadas a microscopía electrónica de transmisión	97
Figura 3.4. Estudio cuantitativo de la progresión de la carga amiloide de forma comparativa en CA1 y subículo de ratones APP/PS1 desde los 4 a los 18 meses de edad	99
Figura 3.5. Estudio cuantitativo y comparativo de la carga amiloide total y fibrilar en el hipocampo de ratones APP/PS1 desde los 4 a los 18 meses de edad	100
Figura 3.6. Cambios en el tamaño de las placas fibrilares TioS-positivas en la región CA1 del hipocampo de ratones APP/PS1 de los 4 a los 18 meses de edad	101
Figura 3.7. Imágenes comparativas de la patología amiloide en el hipocampo de APP/PS1 de 6 meses de edad	104
Figura 3.8. La mayoría de las placas amiloides poseen core fibrilar TioS-positivo en el hipocampo del modelo APP/PS1	105
Figura 3.9. Las placas fibrilares poseen un halo de A β que es negativo para Tioflavina-S	106
Figura 3.10. El halo de las placas fibrilares está formado por A β oligomérico	107
Figura 3.11. A nivel ultraestructural la inmunotinción para A β se localiza en las fibras amiloides de la periferia de las placas	108
Figura 3.12. Estudio del tamaño del halo oligomérico que rodea a las placas amiloides empleando los marcadores anti-A β oligomérico (OC) y Tioflavina-S	109
Figura 3.13. Análisis de la dinámica de las placas amiloides fibrilares durante la	110

progresión de la patología en la región CA1 del hipocampo del modelo APP/PS1

Figura 3.14. Las placas amiloides están rodeadas por neuritas distróficas en el hipocampo de ratones APP/PS1 112

Figura 3.15. Las placas amiloides en el modelo APP/PS1 están rodeadas de neuritas distróficas 113

Figura 3.16. Neuritas distróficas englobadas en el citoplasma de prolongaciones astrogliales 114

Figura 3.17. Axones mielínicos distróficos en el hipocampo del modelo APP/PS1 115

Figura 3.18. La cantidad y tamaño de las placas neuríticas aumenta con la progresión de la patología en el hipocampo del modelo APP/PS1 116

Figura 3.19. Estudio cuantitativo de la relación entre el número de neuritas distróficas y el tamaño de las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1 117

Figura 3.20. Estudio metabolómico I 119

Figura 3.21. Estudio metabolómico II 120

Figura 3.22. No existen cambios significativos en las concentraciones de metabolitos relacionados con la producción de energía y la protección antioxidante en función del genotipo (APP/PS1 y WT) o la edad (6 y 12 meses) de los animales 121

3.2. Relación entre las placas amiloides y la microglía durante la progresión de la patología en el modelo APP/PS1

Figura 3.23. La patología amiloide induce en paralelo una fuerte activación microglial en el hipocampo del modelo APP/PS1 124

Figura 3.24. Las placas amiloides presentan una envoltura heterogénea de microglía activada 125

Figura 3.25. Imágenes a microscopía electrónica de transmisión de placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1 126

Figura 3.26. Inmunomarcaje a microscopía electrónica de transmisión de microglía asociada a placa 127

Figura 3.27. Relación microglía-placa a nivel ultraestructural 128

Figura 3.28. Identificación ultraestructural de prolongaciones astrogliales alrededor de las placas amiloides 129

Figura 3.29. La microglía activada incrementa progresivamente con la patología amiloide 131

Figura 3.30. La acumulación de A β oligomérico en el hipocampo del modelo APP/PS1 132

incrementa de forma gradual y significativa con la edad

Figura 3.31. Las células microgliales activadas que rodean las placas son 133
inmunopositivas para CD45

Figura 3.32. Visualización ultraestructural de la microglía activada marcada con anti- 135
CD45

Figura 3.33. Estudio transcriptómico. Aumento en la expresión de genes DAM en 136
microglía activada aislada de corteza e hipocampo de animales APP de 12 meses de
edad

Figura 3.34. La microglía activada alrededor de las placas amiloides expresa CD68 138
(marcador del fenotipo DAM) en el hipocampo del modelo APP/PS1

Figura 3.35. La microglía presenta en su interior A β asociado a lisosomas en el 139
hipocampo del modelo APP/PS1

Figura 3.36. Presencia de cuerpos de fagocitosis en el interior de la microglía 140
asociada a placas amiloides en el hipocampo de APP/PS1

Figura 3.37. Presencia de fagolisosomas con contenido fibrilar electrodensos en el 141
interior de microglía periplaca

Figura 3.38. Características ultraestructurales de la microglía homeostática en el 143
modelo APP/PS1

Figura 3.39. Microglía oscura asociada a las placas amiloides en el hipocampo de 144
APP/PS1

Figura 3.40. Subtipos ultraestructurales de microglía asociada a placa visualizados 146
con inmuno-oro para anti-CD45 a microscopía electrónica de transmisión

Figura 3.41. Las prolongaciones microgliales rodean y envuelven a neuritas 147
distróficas en el hipocampo del modelo APP/PS1

Figura 3.42. Neuritas distróficas internalizadas por células microgliales 149

Figura 3.43. Presencia de fibras amiloides en el citoplasma microglial no asociadas a 151
degradación

Figura 3.44. Estrecha interacción entre el citoplasma microglial y las fibras amiloides 152

Figura 3.45. El retículo endoplasmático rugoso de la microglía está próximo a las 153
fibras amiloides de la periferia de la placa

Figura 3.46. El citoplasma microglial es rico en cisternas de retículo endoplasmático 154
rugoso en la zona de contacto microglía-placa

Figura 3.47. La zona de contacto entre las prolongaciones microgliales y las fibras 156
amiloides puede presentar gran cantidad de mitocondrias

Figura 3.48. Las mitocondrias microgliales se entremezclan con las fibras amiloides en la zona de contacto con las placas	157
Figura 3.49. Aumento de la expresión de galectina-3 con la progresión de la patología en el hipocampo del modelo APP/PS1	158
Figura 3.50. Las células galectina3 positivas que rodean a las placas amiloides son microglía activada	159
Figura 3.51. Galectina3 se localiza principalmente en el citoplasma de la microglía periplaca y, en menor medida, también se asocia a las fibras amiloides	160
Figura 3.52. Acumulación de células gal3-positivas en la zona de la fisura hipocampal	162
Figura 3.53. La acumulación de microglía gal3-positiva en la fisura hipocampal es una característica patológica de los animales APP/PS1	163
Figura 3.54. La microglía alrededor de las placas amiloides expresa ASC (<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>)	164
Figura 3.55. Estrecha relación a nivel ultraestructural entre las prolongaciones microgliales ASC-positivas y las fibras amiloides	165
Figura 3.56. La inmunorreactividad para ASC se localiza preferentemente en el citoplasma microglial que rodea y envuelve a las placas amiloides	166
Figura 3.57. La microglía asociada a placa es TREM2-positiva y aumenta con la patología amiloide en el hipocampo del modelo APP/PS1	168
Figura 3.58. Las prolongaciones microgliales TREM2-positivas forman un anillo que rodea el core de las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1	169
Figura 3.59. Aumento significativo de la carga microglial TREM2-positiva con la progresión de la patología amiloide en el hipocampo de ratones APP/PS1	170
Figura 3.60. TREM2 se localiza en el citoplasma microglial en contacto con las fibras amiloides	172
Figura 3.61. Las células microgliales envuelven y aíslan el core de las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1	173
Figura 3.62. Las placas amiloides grandes tienen menor envoltura microglial y una mayor cantidad de distrofias a su alrededor	174
Figura 3.63. La expresión de ferritina aumenta con la progresión de la patología en el hipocampo del modelo APP/PS1	175
Figura 3.64. Visualización a microscopía electrónica de transmisión de la envoltura microglial periplaca	176
Figura 3.65. Aumento de la cantidad de células ferritina-positivas asociadas a las	178

placas amiloides en el modelo APP/PS1 a medida que progresa la patología	
Figura 3.66. Aumento del recubrimiento microglial ferritina-positivo alrededor de las placas amiloides con la progresión de la patología	179
Figura 3.67. Cambios en el recubrimiento microglial de las placas amiloides de CA1 con la progresión de la patología	180
Figura 3.68. El recubrimiento microglial CD45-positivo disminuye con la edad mientras aumenta el recubrimiento ferritina-positivo	181
Figura 3.69. El recubrimiento microglial es comparativamente mayor en placas pequeñas que en grandes	182
Figura 3.70. Las placas amiloides pequeñas están totalmente recubiertas por microglía	183
Figura 3.71. El recubrimiento microglial es mayor en placas pequeñas que en placas grandes	185
Figura 3.72. La mayoría de células ferritina-positivas que rodean las placas son células microgliales en el hipocampo de APP/PS1 de 6 meses de edad	186
Figura 3.73. La cantidad de células ferritina-positivas periplaca aumenta con la patología amiloide	187
Figura 3.74. El porcentaje de células microgliales periplaca que expresan ferritina aumenta significativamente con la patología	188
Figura 3.75. Subtipos ultraestructurales de microglía asociada a placa que expresa ferritina	191
Figura 3.76. La microglía que rodea el core de las placas presenta engrosamientos en sus prolongaciones	192
Figura 3.77. Ultraestructura de prolongaciones distróficas microgliales	193
Figura 3.78. Caracterización ultraestructural de distrofias microgliales periplaca en el hipocampo de APP/PS1 (I)	194
Figura 3.79. Caracterización ultraestructural de distrofias microgliales periplaca en el hipocampo de APP/PS1 (II)	195
Figura 3.80. La microglía periplaca presenta mitocondrias con alteraciones morfológicas (I)	196
Figura 3.81. La microglía periplaca presenta mitocondrias con alteraciones morfológicas (II)	197
Figura 3.82. La microglía periplaca presenta mitocondrias con alteraciones morfológicas (III)	198

3.3. Estudio *in vivo* de la propagación de la patología amiloide

Figura 3.83. La patología amiloide en el hipocampo de pacientes de Alzheimer es menos acusada que en el modelo APP/PS1	201
Figura 3.84. Detección de A β oligomérico en fracciones solubles S1 procedentes de muestras de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) y de ratones APP/PS1 de 18 meses	202
Figura 3.85. Ensayo de agregación <i>in vitro</i> de muestras S1 procedentes de pacientes de Alzheimer	203
Figura 3.86. Estudios conductuales. Distancia recorrida y velocidad en la prueba de campo abierto (open field)	205
Figura 3.87. Estudios conductuales. Tiempo pasado en la zona externa e interna en la prueba de campo abierto (open field)	206
Figura 3.88. La patología amiloide se acelera en el hipocampo de ratón APP tras 4 meses post-inyección de la fracción S1 de pacientes de Alzheimer	207
Figura 3.89. La inyección intracerebral de la fracción S1 de pacientes de Alzheimer y de APP/PS1 acelera la patología amiloide en el hipocampo del modelo APP	208
Figura 3.90. Los animales WT no desarrollan patología amiloide tras 4 meses de la inyección intrahipocámpal de S1 de pacientes de Alzheimer o de ratones APP/PS1	210
Figura 3.91. La inyección de S1 de pacientes y de APP/PS1 agrava la patología amiloide fibrilar	211
Figura 3.92. La patología amiloide fibrilar aumenta en el hipocampo de animales APP inyectados con S1 de Braak V-VI y de APP/PS1 de 18 meses de edad	212
Figura 3.93. Las fracciones S1 de pacientes de Alzheimer y de APP/PS1 estimulan la respuesta microglial	213
Figura 3.94. Aumento significativo de la respuesta microglial en el hipocampo de animales APP inyectados con S1 de pacientes y con S1 de APP/PS1	214
Figura 3.95. Las fracciones S1 de pacientes de Alzheimer y de APP/PS1 no inducen respuesta microglial <i>in vivo</i> en animales WT a los 4 meses post-inyección	215
Figura 3.96. Estudio de la patología amiloide y neurofibrilar en la corteza frontal del paciente de Alzheimer Braak VI del que se ha obtenido la fracción soluble S1 para las inyecciones en ratones hA β -KI y 3xTgAD	217
Figura 3.97. Detección de formas oligoméricas de A β en la fracción soluble del paciente Braak VI empleada en las inyecciones en ratones hA β -KI y 3xTgAD	218
Figura 3.98. Análisis de la patología amiloide en el hipocampo de ratones 3xTgAD	220

inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 5 meses post-inyección (12-13 meses de edad)

Figura 3.99. Estudio de la carga amiloide en el hipocampo de animales 3xTgAD inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 5 meses post-inyección (12-13 meses de edad) 221

Figura 3.100. Análisis de las placas amiloides fibrilares en el hipocampo de ratones 3xTgAD inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 5 meses post-inyección (12-13 meses de edad) 222

Figura 3.101. Análisis de la patología amiloide en el hipocampo de ratones 3xTgAD inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad) 223

Figura 3.102. Aumento significativo de la carga amiloide en el hipocampo de animales 3xTgAD inyectados con S1 de Braak VI a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad) 224

Figura 3.103. Aumento de la patología amiloide fibrilar en el hipocampo de ratones 3xTgAD inyectados con S1 de Braak VI a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad) 226

Figura 3.104. La fracción S1 de Braak VI no induce patología amiloide a los 5 meses post-inyección en el hipocampo del modelo hA β -KI 227

Figura 3.105. La fracción S1 de Braak VI induce patología amiloide en el hipocampo del modelo hA β -KI a los 10 meses post-inyección 228

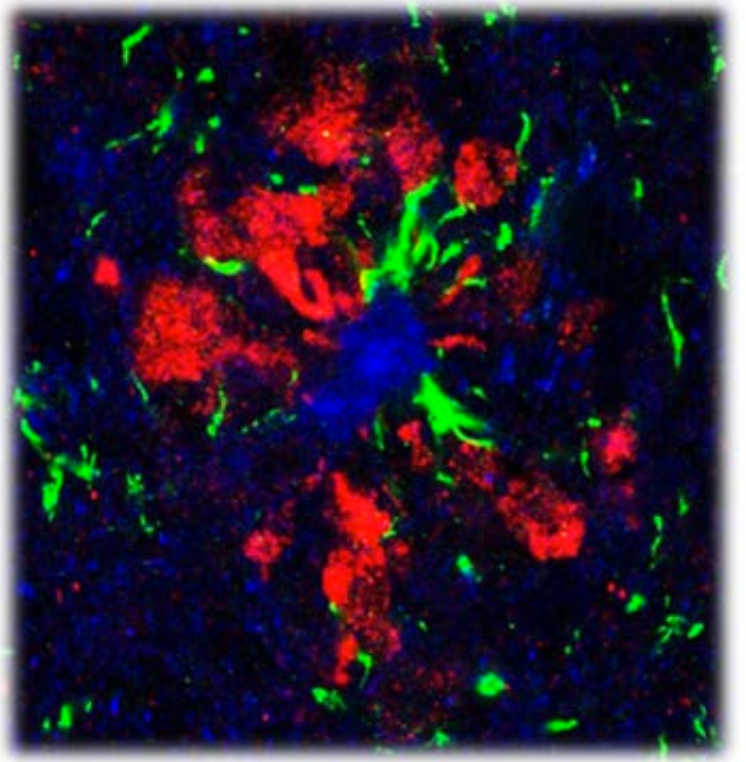
Figura 3.106. Aumento significativo de la carga amiloide en animales hA β -KI inyectados con S1 de Braak VI a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad) 229

4. DISCUSIÓN

231

Figura 4.1. La microglía interviene en el proceso de formación, compactación y aislamiento de las placas amiloides y sufre un proceso de degeneración con la progresión de la patología 256

1. Introducción



1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una proteinopatía neurodegenerativa que cursa con deterioro cognitivo, tratándose de la principal causa de demencia y suponiendo uno de los principales retos de la medicina en el siglo XXI. Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de proteínas tóxicas que agregan y se depositan en el cerebro: el péptido beta-amiloide (A β), que forma las placas amiloides extracelulares, y la proteína Tau hiperfosforilada, que da lugar a los ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFTs). Todo esto va acompañado por un proceso neuroinflamatorio, pérdida sináptica y muerte neuronal (Tatarnikova et al. 2015; Scheltens et al. 2016; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018; Long and Holtzman 2019).

Se trata de una enfermedad progresiva e irreversible, en la cual se produce una primera fase preclínica o asintomática que ocurre décadas antes al inicio de los síntomas. A continuación, tiene lugar la fase prodrómica o de deterioro cognitivo leve, en la que se dan los primeros signos visibles de la enfermedad, que principalmente afectan a la memoria episódica. En la fase avanzada hay una pérdida de memoria que va acompañada de otra serie de alteraciones: desorientación, afasia (trastorno del lenguaje), apraxia (dificultad para realizar movimientos voluntarios), agnosia (incapacidad para reconocer objetos), así como trastorno de la función ejecutiva (resolución de problemas y pensamiento abstracto) (Moodley and Chan 2014; Takahashi et al. 2017; Scheltens et al. 2016). En la fase terminal de la EA, los pacientes presentan un estado vegetativo y acaban muriendo por causas secundarias (neumonía, sepsis, infecciones urinarias, etc). Los síntomas clínicos de la enfermedad se deben a que se producen daños en regiones cerebrales involucradas en la memoria y el aprendizaje, como son hipocampo, corteza entorrinal, amígdala y áreas neocorticales (Castellani et al. 2010; Frere and Slutsky 2018).

En el año 2018, el número de personas con demencia a nivel mundial ascendía a casi 50 millones, de las cuales, aproximadamente dos tercios padecían la EA, mientras que el resto presentaban otros tipos de demencia, como la demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy o la encefalopatía TDP-43 límbico-predominante (LATE). Se estima que el número de afectados llegará a los 152 millones en 2050 (World Alzheimer Report 2018, <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018>; Nelson et al. 2019).

Desde que Alois Alzheimer describió la enfermedad de 1907, ha habido numerosos avances científicos en el conocimiento de los mecanismos de esta. No obstante, aún son muchas las incógnitas sobre los factores desencadenantes de la enfermedad y esta sigue siendo actualmente incurable, puesto que no existe ningún tratamiento que detenga el avance de la patología y los fármacos disponibles solo afectan marginalmente a los síntomas. Además, no se dispone aún de métodos de detección precoz de la enfermedad, siendo solo posible el diagnóstico *post mortem*.

1.1.1. TIPOS DE ALZHEIMER Y FACTORES DE RIESGO

Atendiendo a la edad de inicio de los síntomas, las causas de la enfermedad y la incidencia, se distinguen dos variantes de la EA, aunque ambas tienen en común tanto los síntomas como las alteraciones histopatológicas.

Alzheimer familiar o de inicio temprano (FAD, *Familial Alzheimer's Disease*). Se inicia antes de los 60 años (a partir de los 30 años), tiene un origen genético y supone un 1% de los casos de Alzheimer. Se debe a mutaciones autosómicas dominantes en genes que participan en el procesamiento de A β , como son los genes de la presenilina 1 (*PS1*), la presenilina 2 (*PS2*) y la proteína precursora amiloide (*APP*). Actualmente se conocen más de 200 mutaciones que afectan a estos genes y que causan FAD (AlzForum, <https://www.alzforum.org/mutations>) (Calero et al. 2015; Sasaguri et al. 2017; Shi and Holtzman 2018; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018). Estas mutaciones aumentan la producción de A β , alteran la ratio de las formas de A β_{42} /A β_{40} , o bien afectan a propiedades biofísicas del A β , como su hidrofobicidad y su capacidad de agregación (Karran and De Strooper 2016; Pimenova et al. 2018; Shi and Holtzman 2018).

- Proteína precursora amiloide (*APP*). Su gen se encuentra en el cromosoma 21 y da lugar a las isoformas APP695, APP751 y APP770 por *splicing* alternativo, siendo la isoforma APP695 la que se expresa principalmente en neuronas (Kang and Müller-Hill 1990; Goate et al. 1991; Rohan de Silva et al. 1997). Hasta ahora se han descrito 59 mutaciones en el gen *APP* y la mayoría de ellas causan EA de tipo familiar (AlzForum, <https://www.alzforum.org/mutations>).
- Presenilina 1 (*PS1*). Las presenilinas forman parte del complejo γ -secretasa que procesa APP y da lugar al péptido β -amiloide (De Strooper 2003). El gen de la presenilina 1 se encuentra en el cromosoma 14 y sus mutaciones son la causa más común de FAD, habiendo descritas actualmente 292 mutaciones en dicho gen (Sherrington et al. 1995) (AlzForum, <https://www.alzforum.org/mutations>).
- Presenilina 2 (*PS2*): este gen se localiza en el cromosoma 1, presenta una estructura genética muy similar a la de *PS1*, siendo proteínas homólogas *PS1* y *PS2* y compartiendo en torno al 67% de la secuencia de aminoácidos. En el cerebro, tanto *PS1* como *PS2*, se expresan principalmente en el cerebelo y en el hipocampo (Rogaev et al. 1995; Levy-Lahad et al. 1996). Hoy en día existen 48 mutaciones registradas en el gen *PS1* (AlzForum, <https://www.alzforum.org/mutations>).

Alzheimer esporádico o de inicio tardío (SAD, *Sporadic Alzheimer's Disease*). Comienza a partir de los 60-65 años y constituye el 99% de los casos. Se trata de una enfermedad multifactorial y, aunque actualmente se desconocen sus causas, cada vez se conocen más factores de riesgo implicados, siendo los más importantes la edad y factores genéticos. Hasta ahora, gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, *genome-wide association studies*), se han descubierto más de 30 loci implicados en el riesgo de padecer EA, entre los que se encuentran *APOE*, *CLU*, *PICALM*, *CR1*, *BIN1*, *CD33*, *TREM2*, *ABCA7*, etc. Muchos de estos genes están relacionados con la respuesta inmune, indicando el

importante papel de esta en el desarrollo de la enfermedad (Giri et al. 2016; Calero et al. 2015; Sasaguri et al. 2017; Shi and Holtzman 2018).

- Edad. Es el principal factor de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. Durante el envejecimiento normal ocurre una reducción de tamaño del cerebro que afecta tanto a la sustancia blanca como a la gris, así como un aumento de tamaño de los ventrículos (Draayer 1988). Con la edad, ocurren una serie de alteraciones en el cerebro: disfunción mitocondrial, daño oxidativo en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que se acumulan intracelularmente, desregulación del metabolismo energético, mecanismos de eliminación de residuos celulares dañados (autofagia y proteasoma), fallos en la reparación del ADN, actividad aberrante de circuitos neuronales, desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} neuronal e inflamación (Mattson and Arumugam 2018).
- *APOE* (apolipoproteína E). El gen de *APOE* se encuentra en el cromosoma 19 y presenta tres alelos mayoritarios, *APOEε2*, *APOEε3* y *APOEε4*. La variante *APOEε4* es uno de los mayores factores de riesgo genéticos para el Alzheimer esporádico (Nickerson et al. 2000). La presencia de una sola copia del alelo *APOEε4* aumenta 4 veces la probabilidad de sufrir EA de inicio tardío, mientras que la variante *APOEε2* reduce el riesgo de padecer la enfermedad (Verghese et al. 2011). *APOE* se une al colesterol y otros lípidos para mediar su transporte y los distribuye a las células mediante endocitosis mediada por receptor. También participa en la salida de colesterol de las células (Shi and Holtzman 2018). En el sistema nervioso, se expresa principalmente en astrocitos y, en una menor cantidad, en la microglía. Inicialmente se describió como una proteína de unión a $\text{A}\beta$, implicada en la fibrilación y eliminación de $\text{A}\beta$, influyendo en la cinética de la formación de las placas amiloides (Strittmatter et al. 1993; Huynh et al. 2017a, 2017b). Además, *APOE* interviene en la estimulación del sistema inmune innato en respuesta a la patología amiloide, modulando la actividad microglial (Ulrich et al. 2018).
- *CLU* (clusterina o apolipoproteína J, *APOJ*). El gen de esta glicoproteína se encuentra en el cromosoma 8 y sus niveles de expresión se elevan en condiciones patológicas de daño e inflamación crónica en el cerebro (Calero et al. 2000). *CLU* se expresa principalmente en astrocitos y se ha descrito su presencia en las placas amiloides y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA (Giannakopoulos et al. 1998; McGeer et al. 1992; Calero et al. 2000; Pimenova et al. 2018). Junto con *APOE*, *CLU* es el principal transportador de colesterol en el cerebro. Ambas apolipoproteínas interactúan con el $\text{A}\beta$, participando en su agregación, deposición y eliminación. Se ha observado que *CLU* tiene mayores niveles de expresión en el cerebro en los portadores de *APOEε4*, sugiriendo una inducción de *CLU* en individuos con bajos niveles de *APOE* para compensar la pérdida de función de *APOE* (Harold et al. 2009; Slot et al. 2019). Además, *CLU* participa también en la apoptosis y en la respuesta inmune (Pimenova et al. 2018).
- *TREM2* (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*). Este gen se encuentra en el cromosoma 6 y codifica para una proteína transmembrana de un solo paso que se expresa en células dendríticas, granulocitos, macrófagos y microglía. *TREM2* forma un

complejo junto con las proteínas adaptadoras activadoras DAP12 (*DNAX-activating protein of 12 kDa*) y DAP10 (*DNAX-activating protein of 10 kDa*) en la membrana de la célula, desencadenando una cascada de señalización que da lugar a la respuesta inmune innata (Guerreiro et al. 2013; Jay et al. 2017; Ulland and Colonna 2018). Las mutaciones de pérdida de función de *TREM2* en homocigosis se asocian con la enfermedad de Nasu-Hakola, un tipo de demencia de inicio temprano (Paloneva et al. 2002). Las mutaciones de reducción de función de *TREM2*, como es el caso de la variante R47H de este gen, hacen que aumente el riesgo de desarrollar EA de inicio tardío (Guerreiro et al. 2013; Ulland and Colonna 2018; Gratuze et al. 2018). Otras variantes de *TREM2*, como R62H, también se relacionan con un mayor riesgo de padecer la enfermedad (Jin et al. 2014). *TREM2* podría interactuar directamente con A β y regular su degradación (Zhao et al. 2018b).

- *PICALM* (*phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein*). Este gen se encuentra en el cromosoma 11 y se expresa en todos los tejidos, teniendo una mayor expresión en neuronas. Esta proteína está implicada en la endocitosis mediada por clatrin, esencial para el tráfico intracelular. *PICALM* parece participar en la degradación de fragmentos C-terminales derivados de APP (CTFs) mediante autofagosomas y en la endocitosis mediada por clatrin de la γ -secretasa. En cerebros de pacientes con EA, se ha observado que *PICALM* se escinde de forma anormal y que los niveles de la proteína completa disminuyen (Ando et al. 2013; Moreau et al. 2014; Harold et al. 2009; Pimenova et al. 2018). La deficiencia de *PICALM* provoca una disminución de la eliminación de A β a través de la barrera hematoencefálica y, por consiguiente, una mayor patología amiloide (Zhao et al. 2015).
- Enfermedades cardiovasculares. El envejecimiento está asociado a patologías crónicas como diabetes, obesidad, hipertensión y aterosclerosis, las cuales a su vez parecen contribuir a la inflamación crónica y aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. En modelos animales, tanto la obesidad como la diabetes tipo II exacerban la patología de A β y de Tau (Santos et al. 2017; Newcombe et al. 2018). Además, la acumulación de A β no sólo ocurre en el parénquima nervioso, sino también en los vasos sanguíneos del cerebro, lo cual se denomina angiopatía amiloide cerebral (AAC) (Sweeney et al. 2018; Santos et al. 2017; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018).
- Género. La prevalencia de la EA es mayor en mujeres, lo cual suele atribuirse a su mayor esperanza de vida (Riedel et al. 2016). En los pacientes con EA, la duración de la fase de demencia parece ser mayor en mujeres debido a que este grupo tiene una menor mortalidad. Sin embargo, no se han observado diferencias en función del sexo en la duración de las fases preclínica y prodrómica (Vermunt et al. 2019). Por otro lado, la disminución de los niveles de estrógenos tras la menopausia hace que las mujeres presenten un mayor riesgo de sufrir la EA, puesto que los estrógenos tienen un papel neuroprotector frente a la enfermedad (Yue et al. 2005; Morinaga et al. 2007; Pike et al. 2009).

- Exposición a metales pesados. El manganeso, el plomo, el aluminio y el metilmercurio, entre otros, son neurotóxicos. Los astrocitos acumulan de forma selectiva iones metálicos, lo cual afecta negativamente a la expresión y función de los transportadores de glutamato, impidiendo que los astrocitos retiren el glutamato del espacio extracelular (Verkhatsky and Parpura 2016). En concreto, la exposición a aluminio puede inducir una mayor expresión del gen *APP* y además potenciar el procesamiento proteolítico de esta proteína hacia la vía amiloidogénica (Liang 2018).
- Otros factores. Existe una alta relación entre la salud cardiometabólica y el riesgo de padecer EA. La obesidad, la hipertensión, la diabetes tipo II, una dieta rica en grasas saturadas, el tabaco, un estilo de vida sedentario y la falta de estimulación mental e interacción social son factores de riesgo que se han relacionado con esta enfermedad (Wahl et al. 2019; Scheltens et al. 2016). Llevar un estilo de vida saludable y estimular el cerebro para aumentar la reserva cognitiva ayudan a retrasar la aparición de los síntomas de la EA (van Loenhoud et al. 2019).

1.1.2. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD

A nivel macroscópico, el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una marcada atrofia cortical, los surcos presentan mayor tamaño y las circunvoluciones están reducidas. Además, ocurre una dilatación de los ventrículos cerebrales. Todas estas alteraciones llevan a una disminución del peso y el volumen en comparación con un cerebro sano (figura 1.1). Las regiones con mayor atrofia son aquellas que primero se ven afectadas por la patología de Tau, como son la corteza entorrinal, el hipocampo y la amígdala. También se ve bastante afectada la región implicada en el lenguaje (Perl 2010; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018).

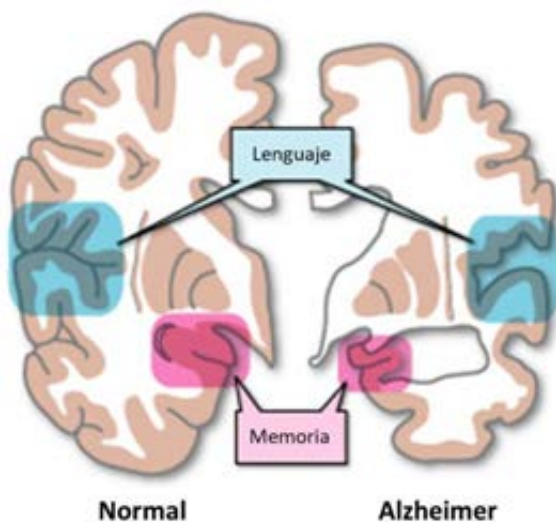


Figura 1.1. Esquema comparativo de un hemisferio cerebral humano no patológico (izquierda) y otro afectado por la enfermedad de Alzheimer (derecha). El cerebro con EA tiene un volumen menor que el cerebro sano, así como el ventrículo dilatado. Las regiones cerebrales más afectadas son el hipocampo (memoria y aprendizaje) y el área de Broca y de Wernicke (lenguaje). Modificado de <https://gamebasedassessmentofdementia.files>.

En cuanto a las alteraciones microscópicas, las principales lesiones características de la enfermedad de Alzheimer son (Masters et al. 2015; Perl 2010; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018):

- Acumulación anormal de proteínas tóxicas en el cerebro en forma de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. El péptido β -amiloide ($A\beta$) se acumula y se agrega, dando lugar a las placas amiloides o seniles, que se depositan tanto en el parénquima nervioso como en la pared de los vasos sanguíneos del cerebro. Por otro lado, la proteína Tau hiperfosforilada también se va acumulando y forma ovillos neurofibrilares dentro de las neuronas (NTFs). Estas dos alteraciones son características de la EA y permiten el diagnóstico definitivo *post mortem* de la enfermedad.
- Pérdida sináptica y muerte neuronal selectiva. La pérdida de sinapsis es una de las alteraciones más tempranas de la EA y la que mejor correlaciona con los síntomas de deterioro cognitivo. La muerte neuronal ocurre principalmente en las regiones más afectadas por la patología de Tau.
- Neuroinflamación crónica con activación astrogial y microglial. Cada vez hay más evidencias del papel clave que juega la glía en la progresión de la patología de la EA.

Otras alteraciones microscópicas que ocurren en el cerebro de los pacientes son degeneración granulovacuolar, hilos del neuropilo y gránulos perisomáticos (Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018).

1.1.3. PÉPTIDO BETA-AMILOIDE

Una de las principales marcas histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer es la presencia de placas amiloides o seniles en el cerebro de los pacientes. Estas se originan por la acumulación y agregación del péptido $A\beta$, el cual se genera a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP).

Proteína precursora amiloide

La proteína precursora amiloide, cuyo gen está localizado en el cromosoma 21 (21q21.3), presenta tres isoformas que se generan por *splicing* alternativo, APP695, APP751 y APP770. Esta proteína se expresa en diversos tejidos. En el cerebro, se expresa en el endotelio, en la glía y en neuronas, siendo en estas últimas APP695 la isoforma predominante (Turner et al. 2003; Arbor et al. 2016; Kang and Müller-Hill 1990; Goate et al. 1991; Rohan de Silva et al. 1997). APP (**figura 1.2**) es una glicoproteína integral de membrana de un solo paso (tipo I) que presenta un dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana y un pequeño dominio citosólico C-terminal (Zhang et al. 2011; Turner et al. 2003; Tatarnikova et al. 2015; Takahashi et al. 2017).

La proteína APP se localiza en las membranas celulares de orgánulos como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, así como en la membrana plasmática. Una vez que APP llega a la membrana plasmática, puede ser procesado en la superficie celular, o bien puede ser reinternalizado y procesado en los lisosomas y en el aparato de Golgi (Turner et al. 2003; Zhang et al. 2011).

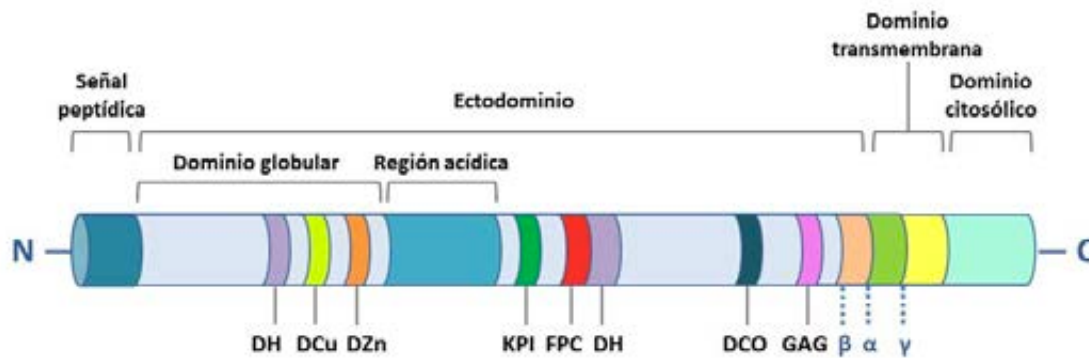


Figura 1.2. Secuencia de la proteína precursora amiloide. APP presenta un dominio citosólico corto, un dominio transmembrana y un ectodominio más extenso. Entre el dominio transmembrana y el ectodominio se encuentran los sitios de corte de las secretasas α , β y γ . Parte del dominio $A\beta$ se encuentra en el ectodominio de APP y la otra parte en el dominio transmembrana. En el ectodominio hay varios sitios de unión a moléculas de la matriz extracelular como el dominio de unión a colágeno (DCO), el dominio de unión a heparina (DH) y el sitio de unión a glucosaminoglucanos (GAG). DCu: dominio de unión a cobre, DZn: dominio de unión a zinc, KPI: dominio inhibidor de la serín proteasa Kunitz (ausente en la isoforma APP695), FPC: factor promotor de crecimiento. Modificado de [Evin and Weidemann, 2002](#).

El papel fisiológico de APP aún no está claro, aunque parece estar involucrada en vías necesarias para el correcto funcionamiento del metabolismo y del desarrollo. A nivel celular, está involucrada en el transporte axonal de proteínas, el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis, la adhesión celular, la transducción de señales transmembrana, el metabolismo del colesterol y el calcio y la transcripción de genes ([Turner et al. 2003](#); [Zhang et al. 2011](#); [Arbor et al. 2016](#)).

Hasta ahora se han descrito casi 60 mutaciones en el gen *APP*, las cuales causan Alzheimer de tipo familiar o de inicio temprano. Estas mutaciones pueden afectar a las propiedades del $A\beta$, aumentando la producción de formas más largas y con mayor capacidad de agregación ([Pera et al. 2013](#); [Sasaguri et al. 2017](#)).

Presenilinas PS1 y PS2

Las presenilinas PS1 y PS2 están implicadas en el procesamiento de APP, ya que forman la porción enzimática de la γ -secretasa, un complejo formado por al menos cuatro subunidades: la porción enzimática (PS1 o PS2), el potenciador de presenilina 2 (Pen2), el nicastrina (Nct) y APH1 (proteína faríngea anterior defectuosa 1). La porción enzimática puede estar formada por la presenilina 1 (PS1) o por la presenilina 2 (PS2) ([Wolfe 2008](#); [Arbor et al. 2016](#); [Sasaguri et al. 2017](#)).

El gen *PS1* se encuentra en el cromosoma 14, mientras que el gen *PS2* se halla en el cromosoma 1 ([Sherrington et al. 1995](#); [Rogaev et al. 1995](#)). PS1 y PS2 son proteínas homólogas transmembrana multipaso con 9 dominios transmembrana, el extremo N-terminal citosólico y el C-terminal extracelular ([Wolfe 2013](#)). En el encéfalo, tanto *PS1* como *PS2* se expresan principalmente en el cerebelo y en el hipocampo ([Rogaev et al. 1995](#); [Levy-Lahad et al. 1996](#)). En cuanto a la localización subcelular de los distintos tipos de γ -secretasa, la variante que presenta PS1 se distribuye ampliamente por la célula, incluyendo la membrana plasmática, el

retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. En cambio, la γ -secretasa que contiene PS2 tiene una localización restringida a los endosomas tardíos y lisosomas (Sannerud et al. 2016).

El complejo la γ -secretasa, además de participar en el procesamiento proteolítico de APP, se encarga de la proteólisis de más de 90 proteínas transmembrana diferentes y aún no se ha determinado una secuencia específica que sea reconocida por dicho complejo. Esto ha llevado a denominarla el “proteasoma de la membrana”. La actividad del complejo γ -secretasa es necesaria en la vía de señalización de Notch, de gran importancia durante el desarrollo (Wolfe 2019a, 2019b, 2013). Otras funciones no proteolíticas de las presenilinas incluyen el tráfico de proteínas, la homeostasis del calcio y la regulación de la señalización por β -catenina (De Strooper et al. 2012).

Hasta ahora, se han descrito 292 mutaciones en el gen *PS1* y 48 mutaciones en el gen *PS2*. Tradicionalmente, dichas mutaciones se han asociado con un aumento en la ratio de las especies $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ y con un incremento en la producción de formas más largas y más neurotóxicas de $A\beta$, como el $A\beta_{43}$. Sin embargo, en algunas mutaciones que causan FAD no ocurre un aumento de la ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ y si esto ocurre lo hace en un contexto en el cual no hay un aumento en la producción total de $A\beta$ (Wang et al. 2017a; Pimenova et al. 2018).

Procesamiento de APP y formación de $A\beta$

La proteína precursora amiloide da lugar al péptido $A\beta$ por la acción secuencial de la β -secretasa y la γ -secretasa. El $A\beta$ se genera de forma normal durante el envejecimiento, pero en la enfermedad de Alzheimer este proceso se ve aumentado y dicho péptido tiende a acumularse en forma de placas amiloides insolubles, que aparecen en el parénquima nervioso.

La proteína APP es sintetizada en el retículo endoplasmático y transportada a la superficie celular a través de la red Golgi/trans-Golgi. Durante su transporte, APP sufre modificaciones post-traduccionales, como N- y O-glicosilación, fosforilación, ubiquitinación y sulfatación de tirosinas (Agostinho et al. 2015). APP puede ser procesada por distintas vías, por un lado, están las vías canónicas (amiloidogénica y no amiloidogénica), en las que intervienen la α -, la β - y la γ -secretasa; y, por otro lado, están las vías no canónicas, en las cuales intervienen otras enzimas. No obstante, la principal fuente de producción de $A\beta$ es la vía canónica amiloidogénica. El tráfico celular de APP es determinante de cara al tipo de procesamiento que va a sufrir la proteína. Una elevada retención de APP en compartimentos ácidos, como los endosomas, favorece el procesamiento amiloidogénico, mientras que la disminución de la internalización de APP desde la membrana favorece la vía de procesamiento no amiloidogénica (Jiang et al. 2014a). Algunos receptores de APOE interaccionan con APP, modulando el procesamiento de dicha proteína. En modelos animales, se ha observado que el receptor LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*) acelera el tráfico endocítico de APP y por tanto favorece la vía amiloidogénica, mientras que el receptor LRP6 (*low density lipoprotein receptor-related protein 6*) parece reducir la producción de $A\beta$ (Zerbinatti et al. 2004; Liu et al. 2014).

Las vías canónicas de procesamiento de APP, en las cuales participan las enzimas α -secretasa, β -secretasa y la γ -secretasa, son dos (figura 1.3):

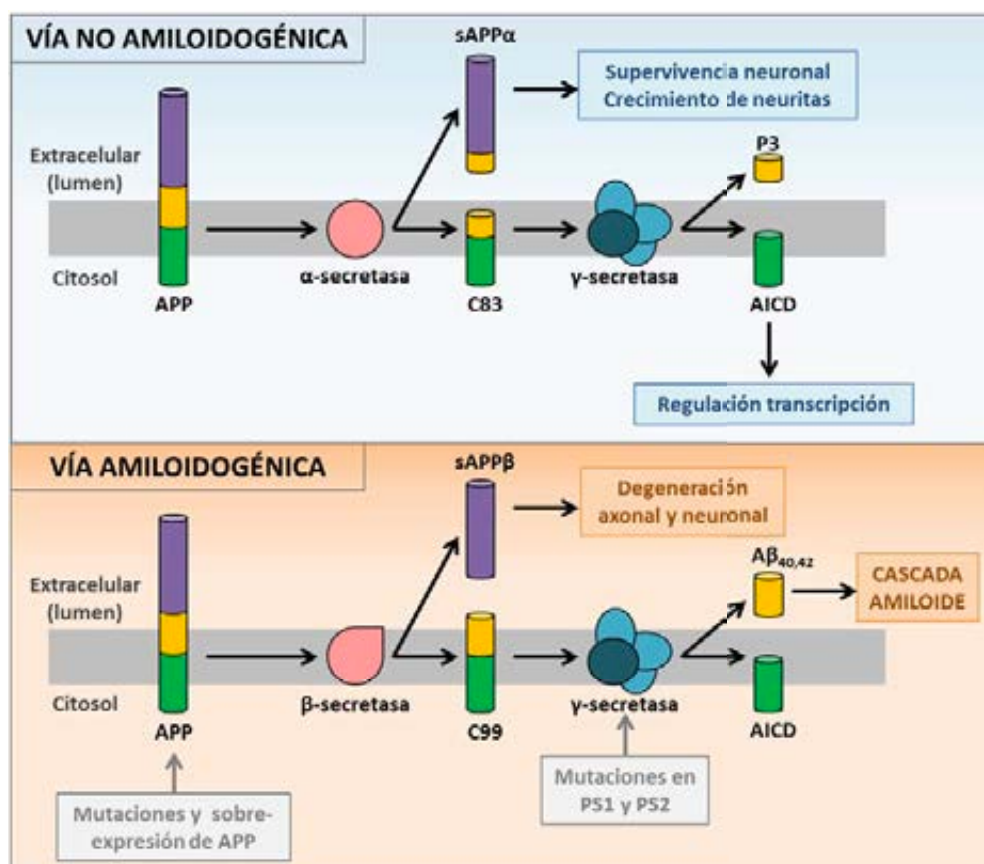


Figura 1.3. Vías canónicas de procesamiento de la proteína precursora amiloide. Mediante la vía no amiloidogénica actúan secuencialmente la α - y la γ -secretasa, dando lugar a $sAPP\alpha$, p3 y AICD. Por la ruta amiloidogénica, por la acción de la β - y la γ -secretasa, se forma $sAPP\beta$, $A\beta$ y AICD. Modificado de Kim and Tsai 2009.

- Ruta no amiloidogénica. En esta ruta están implicadas la α -secretasa y la γ -secretasa. La α -secretasa es una zinc metaloproteasa que se encuentra en la membrana plasmática. Esta vía comienza en la membrana plasmática, puesto que es donde se encuentra la α -secretasa, que realiza el procesamiento proteolítico de APP dentro del dominio $A\beta$, en el aminoácido 17, con lo cual no se produce dicho péptido. Como resultado, se genera $sAPP\alpha$ ($APP\alpha$ soluble), el cual es secretado al espacio extracelular, y α -CTF o C83 (fragmento carboxilo terminal α de 83 aminoácidos). C83 permanece en la membrana y puede ser internalizado para ser procesado por la γ -secretasa en los endosomas, dando lugar al péptido p3 y al dominio intracelular de APP (AICD) (Thinakaran and Koo 2008; Eggert 2017; Zhang et al. 2011; Takahashi et al. 2017).

- Ruta amiloidogénica. En esta vía actúan secuencialmente la β -secretasa y la γ -secretasa. La β -secretasa o BACE (*β -site APP cleaving enzyme*) es una aspartil proteasa que se encuentra principalmente en rafts de membrana en compartimentos celulares ácidos, como los endosomas, el retículo endoplasmático (RE) o el trans-Golgi (Yuksel and Tacal 2019; Arbor et al. 2016). Primero, APP se internaliza desde la membrana celular hacia los endosomas, RE y trans-Golgi. Ahí, la β -secretasa rompe APP en el extremo N-terminal del dominio $A\beta$, lo cual genera $sAPP\beta$ ($APP\beta$ soluble), que se libera a la luz del endosoma, y β -CTF o C99 (fragmento carboxilo terminal β de 99 aminoácidos), que permanece anclado a la membrana. A continuación, la γ -secretasa actúa sobre el fragmento C99 y lo rompe en el extremo C-terminal del dominio $A\beta$, dando lugar péptidos $A\beta$ de 43-51 aminoácidos y al fragmento AICD (Takami et

al. 2009; Takahashi et al. 2017; Eggert 2017). La γ -secretasa inicialmente corta APP en el dominio transmembrana para dar lugar mayoritariamente a formas de A β de 48 o 49 aminoácidos. A continuación, va cortando estas formas largas por el extremo C-terminal en intervalos de 3 aminoácidos principalmente, dando lugar a A β_{49} \rightarrow A β_{46} \rightarrow A β_{43} \rightarrow A β_{40} (vía del A β_{40}) y a A β_{48} \rightarrow A β_{45} \rightarrow A β_{42} \rightarrow A β_{38} (vía del A β_{42}) (figura 1.4). Algunas mutaciones en *PS1* causan una disminución de la capacidad de la γ -secretasa de realizar este corte a partir de A β_{49} y A β_{48} (Takami et al. 2009; Wolfe 2019b). El A β puede tener una longitud variable, pero la forma más abundante es A β_{40} (aproximadamente el 90%), seguida de A β_{42} , la cual supone aproximadamente un 5-10% del total de A β que se produce (Gouras et al. 2000; Eggert 2017). Las distintas formas de A β son liberadas al espacio extracelular vía exosomas, y se agregan dando lugar a oligómeros solubles, protofibrillas, fibrillas y placas amiloides (Chen et al. 2017).

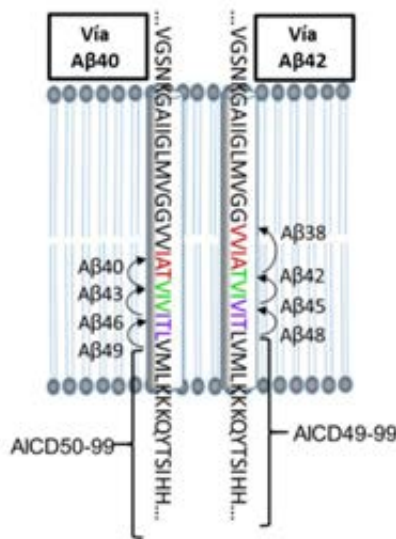


Figura 1.4. Sitios de corte de la γ -secretasa en el fragmento C99. La γ -secretasa rompe el fragmento C99 generando péptidos A β de 49 o 48 aminoácidos. A continuación realiza cortes en intervalos de 3 aminoácidos, dando lugar a A β_{40} y a A β_{42} así como otras formas de A β . Modificado de Wolfe 2019b.

El procesamiento proteolítico de APP no solo da lugar a A β , sino también a otros muchos fragmentos con diversas funciones. Mientras que el A β es neurotóxico, el fragmento sAPP α , que se genera en la vía no amiloidogénica, parece tener propiedades neuroprotectoras, ya que interviene en la supervivencia neuronal, la formación de neuritas, la sinaptogénesis, la adhesión celular, la regulación de la proliferación de células madre embrionarias y adultas, protege contra la excitotoxicidad y la desmielinización. Los péptidos p3, también resultantes de la vía no amiloidogénica, producen apoptosis neuronal y se han encontrado en las placas amiloides de tipo difuso. Por la vía amiloidogénica se genera el fragmento sAPP β , que media la poda sináptica (pruning) y la muerte neuronal (Yuksel and Tacal 2019). El fragmento β -CTF o C99, también generado en la vía amiloidogénica, cuando se sobreexpresa parece tener un efecto citotóxico y causar degeneración neuronal. El fragmento AICD, que se forma tanto por la vía amiloidogénica como por la no amiloidogénica, regula la transcripción de genes como *APP*, *GSK-3 β* (glucógeno sintasa quinasa 3 beta), *neprilisina*, *BACE1*, *LRP1*, etc. Además AICD facilita la interacción de APP con varios factores citosólicos que regulan el tráfico intracelular de APP (Zhang et al. 2011).

Las vías no canónicas son nuevas hipótesis alternativas de procesamiento de la proteína precursora amiloide. Entre estas vías, se incluyen la de la δ/η -secretasa y la meprina β . La hipótesis de la δ/η -secretasa propone que estas dos enzimas actúan junto con las

enzimas de las vías canónicas, generando distintos fragmentos derivados de APP (ver revisión Andrew et al. 2016). Además de las vías anteriormente mencionadas, las caspasas, principalmente la caspasa-3, también rompen APP en el dominio citosólico durante la apoptosis, liberando el fragmento C31, que contiene los últimos 31 aminoácidos de APP. Posteriormente, la γ -secretasa rompe este fragmento, dando lugar a Jcasp. Tanto C31 como Jcasp son neurotóxicos (Zhang et al. 2011). No obstante, el que aún no se hayan identificado mutaciones de Alzheimer familiar en los genes de estas secretasas alternativas hace que se ponga en duda la importancia de dichas vías frente a las clásicas.

La formación de $A\beta$ es un proceso que ocurre durante el envejecimiento normal, pero en la enfermedad de Alzheimer, este se ve exacerbado, produciéndose un aumento de $A\beta$ y/o de la ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ que tiende a acumularse en forma de oligómeros solubles y de placas amiloides, cuya relación con la patología de la enfermedad se tratará en el apartado 1.2.

1.1.4. TAU

Tau es la principal proteína asociada a microtúbulos en las neuronas y juega un papel fundamental en el ensamblaje y estabilización de estos. En las neuronas inmaduras, Tau se distribuye por toda la célula, mientras que en neuronas maduras se encuentra solo en los axones (Krüger and Mandelkow 2016). El gen de la proteína Tau se denomina *MAPT* (del inglés *microtubule-associated protein tau*), se encuentra en el cromosoma 17 y da lugar a 6 isoformas de Tau. La región N-terminal de la proteína puede estar formada por ninguna, una o dos inserciones (0N, 1N o 2N) por *splicing* alternativo de los exones 2 y 3. El dominio repetitivo C-terminal puede presentar tres o cuatro repeticiones (3R o 4R), por *splicing* en el exón 10 (LaFerla and Oddo 2005; Woerman et al. 2016; Gibbons et al. 2018).

En la enfermedad de Alzheimer, ocurre una hiperfosforilación anormal de Tau (figura 1.5), esta proteína se pliega de forma alternativa y se produce la disociación de Tau con los microtúbulos, lo que lleva a la disrupción de la estructura de los microtúbulos. La ruptura de los microtúbulos provoca fallos en el transporte axonal, con la consiguiente pérdida de la función sináptica, acumulación de material intraaxonal, dando lugar a la formación de neuritas distróficas y, posiblemente, a la muerte neuronal. La proteína Tau hiperfosforilada tiende a acumularse en el compartimento somatodendrítico en forma de filamentos pareados helicoidales (PHF), que a su vez dan lugar a ovillos neurofibrilares (NFTs) (Spires-Jones and Hyman 2014; D'Orange et al. 2018; LaFerla and Oddo 2005). Además de acumularse en el soma de las neuronas en forma de NFTs, los agregados de Tau hiperfosforilado se acumulan también en las dendritas y axones (hilos neuropílicos) y llegan a formar neuritas distróficas alrededor del núcleo de las placas amiloides fibrilares (Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018). La fosforilación de Tau depende de diversas quinasas, y parece que la acumulación de $A\beta$ promueve la fosforilación de Tau a través de la quinasa GSK-3 β . La hiperfosforilación y plegamiento alternativo de Tau también pueden ser inducidos por excitotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación (Wang et al. 2012; Guedes et al. 2018; Krüger and Mandelkow 2016).

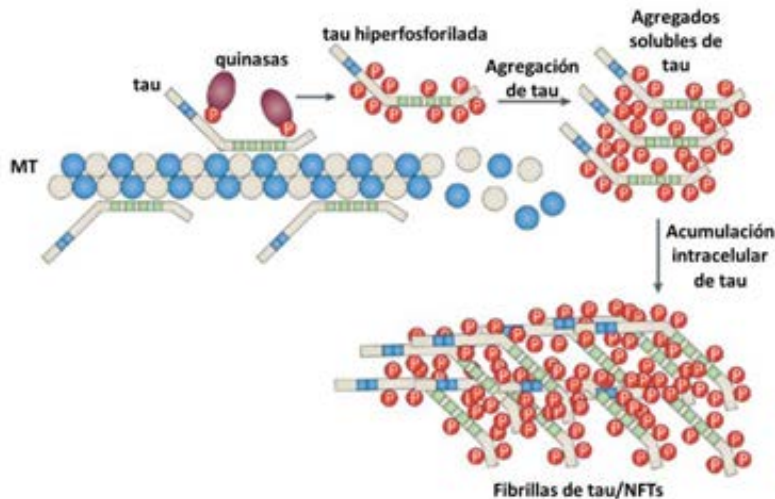


Figura 1.5. Hiperfosforilación y agregación de Tau. Cuando Tau es hiperfosforilado por enzimas quinazas, se disocia de los microtúbulos y estos se disgregan. A su vez, Tau hiperfosforilado tiende a agregarse dando lugar a fibrillas y a ovillos neurofibrilares (NFTs). Modificado de Götz and Ittner 2008.

Los ovillos neurofibrilares son una de las principales marcas histopatológicas de la EA. Tradicionalmente se ha pensado que la toxicidad de Tau se debía principalmente a los ovillos neurofibrilares, puesto que se vio correlación entre la cantidad de NFTs y el nivel de deterioro cognitivo. Sin embargo, la cantidad de pérdida neuronal es mucho mayor que el número de NFTs. Hoy en día se cree que los oligómeros solubles de Tau hiperfosforilado son los principales agentes responsables de la toxicidad de dicha proteína (D'Orange et al. 2018).

La patología neurofibrilar se extiende en los pacientes de Alzheimer siguiendo un patrón de distribución determinado, en base al cual se establecen los distintos estadios de Braak (Braak and Braak 1991) según las regiones afectadas. Sin embargo, aún no está claro el mecanismo de propagación de Tau. Se cree que la proteína con plegamiento alternativo actúa de forma parecida a un prion y se extiende mediante auto propagación de célula a célula (*seeding*), actuando como una semilla para la formación de más priones. Así, las neuronas afectadas, liberarían Tau con una conformación patológica, el cual sería internalizado por neuronas sanas e induciría en ellas el plegamiento alternativo y agregación de Tau. De este modo, la patología de Tau se extendería a través de regiones conectadas sinápticamente (Woerman et al. 2016; Krüger and Mandelkow 2016; Gibbons et al. 2018).

1.1.5. RESPUESTA INFLAMATORIA

Las enfermedades neurodegenerativas suelen estar asociadas a un proceso neuroinflamatorio. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares está acompañada por una respuesta inflamatoria mediada por la activación de la microglía y astrogía. La inflamación es beneficiosa, ya que trata de eliminar una amenaza cuando se detecta la presencia de organismos patógenos o moléculas tóxicas. Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer, esta inflamación se cronifica y se liberan gran cantidad de moléculas proinflamatorias que provocan daño sináptico y muerte neuronal, contribuyendo a la progresión de la patología (Heneka et al. 2015a; Guerriero et al. 2017).

Ya en la década de los 90, los estudios epidemiológicos indicaban que las personas que tomaban antiinflamatorios de forma crónica parecían tener un menor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, indicando la importancia de la glía en la EA (Stewart et al. 1997; in 't

Veld et al. 2001). Además, la microglía y los astrocitos se encuentran rodeando las placas amiloides en dicha enfermedad (Itagaki et al. 1989; Serrano-Pozo et al. 2013). Hoy en día, cada vez son mayores las evidencias que sugieren que la disfunción de la respuesta inmune juega un importante papel en la enfermedad de Alzheimer. Los estudios de GWAS han revelado que muchos de los genes relacionados con la EA de inicio tardío son aquellos que se expresan en la glía (principalmente en la microglía) e intervienen en la inflamación. Algunos de estos genes relacionados con la respuesta inmune y el riesgo de padecer Alzheimer son *APOE*, *TREM2*, *CD33*, *CR1*, *CLU*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *ABCA7*, *INPP5D*, *EPHA1*, etc. Gracias a la identificación de estos genes, en los últimos años muchos estudios se están centrando en el papel de estos en la progresión de la patología (Calero et al. 2015; Zhao et al. 2018b).

Microglía

La microglía constituye el 5-10% de las células del cerebro y son los macrófagos residentes en el sistema nervioso central (SNC). Esta población se genera durante el desarrollo embrionario a partir de precursores mieloides que se encuentran en el saco vitelino, que además dan lugar también a los macrófagos de otros tejidos. La población microglial en el cerebro adulto se mantiene principalmente mediante autorrenovación, siendo mínima la aportación a partir de precursores hematopoyéticos. No obstante, en enfermedades que afectan a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, puede haber infiltración de monocitos sanguíneos, que se diferencian dando lugar a células similares a la microglía (Ginhoux et al. 2010; Prinz et al. 2011; Aguzzi et al. 2013; Ginhoux and Guilliams 2016; Song and Colonna 2018).

La microglía lleva a cabo múltiples funciones en el sistema nervioso central (figura 1.6). Una de las principales funciones de la microglía es monitorizar constantemente el estado del parénquima cerebral a través de sus prolongaciones, extendiéndolas y retrayéndolas. La microglía interacciona con todos los componentes del SNC y participa en el mantenimiento de las neuronas y las sinapsis sanas. Durante el desarrollo, interviene en la neurogénesis, la muerte celular programada, la eliminación de sinapsis y la remodelación de circuitos neuronales. La microglía es la coordinadora de la respuesta inmune en SNC, detecta agentes patógenos y lesiones, se activa y libera moléculas para reclutar a otras células inmunes y generar una respuesta inflamatoria para combatir la amenaza. La microglía también fagocita células muertas, células que están muriendo y a veces células sanas (Li and Barres 2017; Abbott 2018; Hansen et al. 2018; Song and Colonna 2018; ver revisión en Sierra et al. 2019).

Además, la microglía es el principal tipo celular en el CNS que expresa las moléculas que intervienen en el sistema del complemento, entre las que se incluyen C1q (componente del complemento 1q), C3 (componente del complemento 3), C4 (componente del complemento 4), CR3 (receptor del complemento tipo 3, también denominado CD11b) y CR5 (receptor del complemento tipo 5). El sistema del complemento es fundamental para la defensa contra patógenos y la eliminación de restos celulares, pero también interviene en la poda sináptica, en la pérdida sináptica asociada a enfermedades y en el deterioro cognitivo con el envejecimiento. De este modo, las sinapsis aberrantes son marcadas por las moléculas del sistema del complemento para ser fagocitadas por la microglía (Li and Barres 2018; Hansen et al. 2018; Edwards 2019). Algunas de estas proteínas microgliales se agregan formando

complejos denominados inflamasomas. Los inflamasomas son eliminados una vez que han realizado su función, sin embargo, en la EA estos permanecen activados, siguen liberando moléculas inflamatorias y no consiguen eliminar los depósitos amiloides, que se van acumulando (Abbott 2018; Heneka et al. 2018).

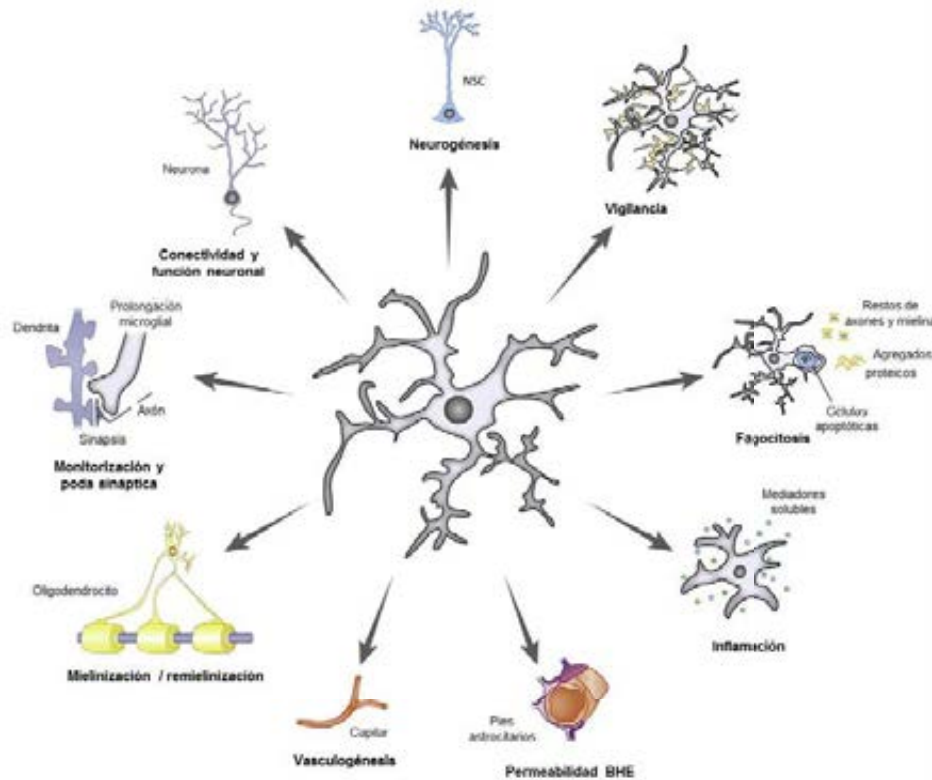


Figura 1.6. Funciones clave de la microglía. La microglía interactúa con todos los elementos celulares del SNC, neuronas y glía, y realiza funciones de vigilancia y monitorización del parénquima nervioso, respondiendo frente a patógenos y señales de daño mediante la fagocitosis y liberación de mediadores solubles. Modificado de Sierra et al., 2019.

La microglía, cuando no está activada, presenta prolongaciones muy ramificadas y un cuerpo celular pequeño y compacto. Cuando una célula microglial pasa a estado activado o reactivo, su cuerpo celular se hace más grande, mientras que las prolongaciones se acortan, se engrosan y disminuyen en número. Estos cambios morfológicos en el estado reactivo van acompañados de una mayor actividad fagocítica y cambios en la expresión de genes y en la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores tróficos. Tradicionalmente, se ha dividido a la microglía en los estados de activación M1 (tóxico) y M2 (protector), aunque hoy en día se piensa que existe un único espectro de activación (Li and Barres 2018). La microgliosis, en la cual la microglía se activa, prolifera y cambia su morfología, es una característica común en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas. Estudios transcriptómicos de la microglía en diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluye la EA, ha revelado que la respuesta en cuanto a la expresión de genes sigue un patrón similar en estas patologías. Esto ha llevado al uso del término DAM, del inglés *disease-associated microglia* (microglía asociada a enfermedad). La microglía con un perfil transcripcional DAM se caracteriza por un aumento de la expresión de genes como *APOE*, *TREM2*, *DAP12*, *ITGAX*, *CD11C*, *AXL*, *CLEC7A*, *CST7*, *SPP1*, *GNPMB* y *LGALS3*; y una disminución de la expresión de genes de la microglía homeostática

como *TMEM119*, *P2RY12* y *CX3CR1*. Los estudios de *single-cell RNA-seq* indican que la microglía en enfermedades neurodegenerativas forma un único espectro de activación, adquiriendo progresivamente niveles mayores de expresión de los genes DAM, en lugar de tener dos estadios de activación diferenciados (M1 y M2) (Holtman et al. 2015; Keren-Shaul et al. 2017; Song and Colonna 2018).

El cambio de la microglía hacia el patrón de expresión DAM parece ser inducido por la acumulación de restos de mielina, células apoptóticas y agregados proteicos en el cerebro. *TREM2*, que tiene una alta expresión en la microglía homeostática y se sobreexpresa en la microglía DAM, interviene en dicha activación. *TREM2* es un receptor de membrana de la microglía que, gracias a la interacción con la proteína activadora DAP12, activaría diversas vías de transducción de señales que promueven la quimiotaxis, la fagocitosis, la supervivencia y la proliferación. La activación DAM de la microglía parece ser un proceso en dos pasos (figura 1.7), con una activación inicial independiente de *TREM2*, en la que baja la expresión de los genes de la microglía homeostática y se sobreexpresan genes como *DAP12* y *APOE*, seguida de una activación dependiente de *TREM2*. De este modo, *TREM2* es necesario para la activación DAM completa, pero no es la única vía implicada, ya que la microglía *TREM2*⁻ puede sobreexpresar solo una parte de los genes DAM. *APOE*, relacionado con el transporte de lípidos, la compactación y eliminación del A β , es otro de los genes relacionados con el patrón de activación DAM, y su sobreexpresión es independiente de *TREM2*. Al eliminarse *APOE* se produce una reducción de la activación DAM, aunque no tan marcada como cuando se elimina *TREM2*. *APOE*, liberado por la microglía DAM, mantiene la activación, ya que a su vez activa a miR-155 que inhibe la expresión de los genes homeostáticos. Además, los interferones tipo I (IFN α e IFN β) y tipo II (IFN γ) también podrían regular la activación DAM de la microglía (Krasemann et al. 2017; Keren-Shaul et al. 2017; Song and Colonna 2018; Hansen et al. 2018).

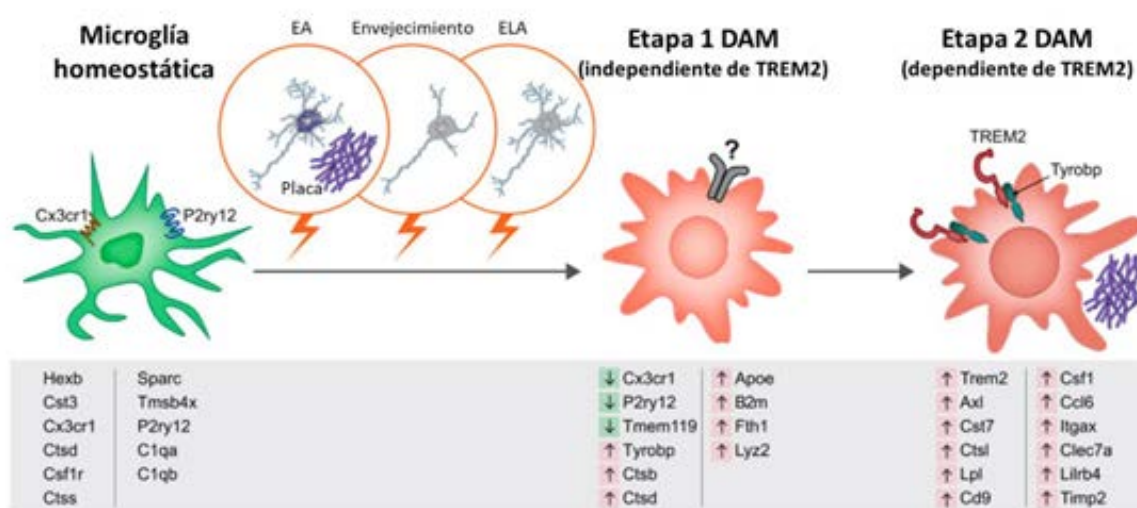


Figura 1.7. Activación de la microglía DAM en enfermedades neurodegenerativas. Cuando ocurre neurodegeneración (enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, envejecimiento) se producen una serie de alteraciones en el SNC que llevan a la activación del patrón de expresión DAM de la microglía. Se produce una disminución en la expresión de genes homeostáticos (*TMEM119*, *P2RY12*, *CX3CR1*, etc) y un aumento de la expresión de genes relacionados con la activación (*APOE*, *TREM2*, *CD11C*, etc). Esto ocurre en dos etapas, la etapa 1 independiente de *TREM2* y la etapa 2 dependiente de *TREM2*. Como consecuencia, ocurren cambios morfológicos y un aumento de la fagocitosis. Modificado de Keren-Shaul et al. 2017.

Aunque se ha descrito que en la enfermedad de Alzheimer ocurre una microgliosis alrededor de las placas amiloides, aún no está clara la función (fagocitosis, aislamiento, fibrilación) que desempeñan con respecto a la patología amiloide, ni si dicha función es beneficiosa o perjudicial. La relación de la microglía con la patología amiloide se discutirá en el [apartado 1.3](#).

Astroglía

La astroglía comprende una población heterogénea que se origina a partir de las células neuroepiteliales, al igual que las neuronas. Los astrocitos son células con una gran cantidad de ramificaciones que se extienden desde el cuerpo celular, pequeño y redondeado, dándole una característica morfología estrellada. Cada astrocito cubre su propio dominio espacial en el cerebro y sus prolongaciones no se solapan con las de otro astrocito. La astroglía, además, se caracteriza por la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) ([Bushong et al. 2002](#); [Osborn et al. 2015](#); [Verkhratsky et al. 2016](#)).

Clásicamente, se pensaba que los astrocitos eran células pasivas, que daban soporte. Sin embargo, actualmente se sabe que tienen una amplia gama de funciones ([figura 1.8](#)), tanto en condiciones fisiológicas como patológicas ([Capani et al. 2016](#); [Verkhratsky and Nedergaard 2018](#)). Los astrocitos están en íntimo contacto con las neuronas, las protegen del estrés oxidativo, dan soporte estructural a las sinapsis, y se comunican de forma bidireccional con las neuronas. Llevan a cabo la modulación de la función sináptica, formando parte de la sinapsis tripartita ([Osborn et al. 2015](#)). Los astrocitos expresan receptores de membrana metabotrópicos e ionotrópicos para detectar la actividad neuronal. Además, presentan transportadores de glutamato y de ácido gamma-aminobutírico (GABA) para internalizar el exceso de neurotransmisores en el espacio extracelular. Además, regulan los niveles de potasio extracelular, siendo de gran importancia en el control de la excitabilidad neuronal. Los astrocitos proveen a las neuronas de diversos metabolitos, siendo el principal proveedor de glutamina de las neuronas ([Kofuji and Newman 2004](#); [Halassa and Haydon 2010](#)). También se encargan de regular la permeabilidad de la barrera hematoencefálica según las necesidades de las neuronas. Además de detectar señales provenientes de las neuronas, los astrocitos también mandan señales a estas vía gliotransmisores como el glutamato o la D-serina ([Ugbode et al. 2017](#); [Osborn et al. 2015](#); [Capani et al. 2016](#); [Khakh and Deneen 2019](#)).

Además de las funciones fisiológicas de los astrocitos, en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, los astrocitos se activan, sufriendo cambios morfológicos y funcionales, dando lugar a astrogliosis. Cuando los astrocitos se activan, se produce un aumento de la expresión de *GFAP*, *Vimentina*, *Nestina* y *Sinemina* ([Hol and Pekny 2015](#); [Ben Haim et al. 2015](#)). Además, las prolongaciones principales se hipertrofian, produciéndose un engrosamiento y una polarización hacia la zona de la lesión. El cuerpo celular aumenta de tamaño. La activación astrogliar se debe a la alteración de la homeostasis en el cerebro y es consecuencia de la liberación de citoquinas proinflamatorias, como la interleucina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral α (TNF α), que son liberadas por la microglía y por la propia astroglía, produciéndose una retroalimentación positiva ([Osborn et al. 2015](#); [Ben Haim et al. 2015](#)).

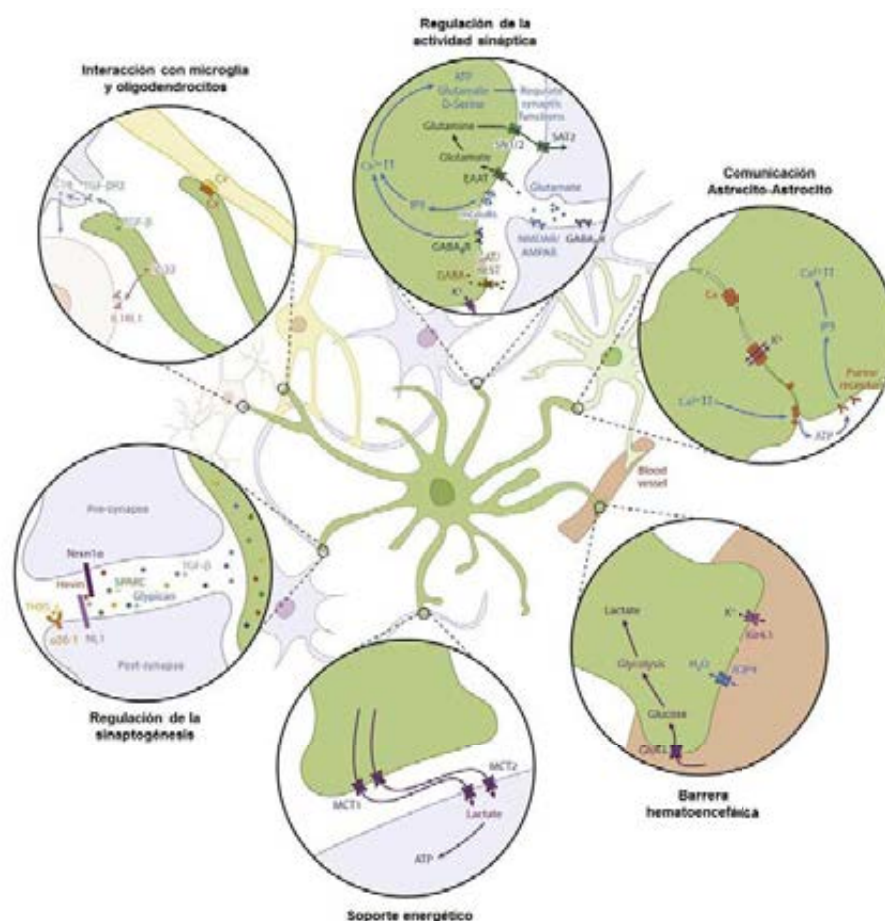


Figura 1.8. Funciones fisiológicas de los astrocitos. Los astrocitos realizan numerosas funciones de mantenimiento del medio extracelular (homeostasis), regulan la sinaptogénesis y la actividad sináptica, y suministran nutrientes a las neuronas para permitir su actividad. Modificado de [Khakh and Deneen \(2019\)](#).

Algunos de los genes que se han identificado como factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer, como *APOE* y *CLU*, se expresan principalmente en los astrocitos, lo cual sugiere el importante papel que tienen estos en la EA. En la enfermedad de Alzheimer, los astrocitos reactivos rodean a las placas amiloides, que también están rodeadas de células microgliales activadas y neuritas distróficas. El papel de los astrocitos alrededor de las placas amiloides, al igual que el de la microglía, no está claro. Por un lado, los astrocitos podrían estar contribuyendo al avance de la neurodegeneración, al liberar moléculas proinflamatorias que resultan citotóxicas. Por otro lado, podrían estar ejerciendo un papel neuroprotector, tratando de neutralizar las placas amiloides ([Osborn et al. 2015](#); [Ugbode et al. 2017](#)). Diversos estudios apuntan hacia una función beneficiosa de los astrocitos. En un modelo animal amiloidogénico, al eliminar el gen *GFAP*, se observó que había un mayor número de placas amiloides y estas tenían un mayor tamaño ([Kraft et al. 2013](#)). Además, los astrocitos pueden fagocitar y degradar el A β , contribuyendo por tanto a la reducción de la patología amiloide ([Xiao et al. 2014](#)). También se ha observado que la astrogliá reactiva alrededor de las placas amiloides tiene la capacidad de fagocitar neuritas distróficas, tanto en un modelo animal APP/PS1 como en tejido humano ([Gomez-Arboledas et al. 2017](#)). Por tanto, los astrocitos podrían tener un doble papel durante la progresión de la EA, en un principio tendrían una función beneficiosa

fagocitando y eliminando el A β , pero con la progresión de la patología, podrían volverse disfuncionales.

1.1.6. DISFUNCIÓN SINÁPTICA Y MUERTE NEURONAL

Otra característica clave en la enfermedad de Alzheimer es la disfunción sináptica y la muerte neuronal, que son las causantes en última instancia del deterioro cognitivo asociado a la enfermedad. De hecho, la pérdida de sinapsis en el cerebro de pacientes con Alzheimer es la alteración que mejor se correlaciona con el deterioro cognitivo (Davies et al. 1987; DeKosky and Scheff 1990; Terry et al. 1991). En esta enfermedad ocurre una disminución de la densidad de espinas dendríticas, una pérdida de sinapsis y muerte neuronal en áreas específicas del cerebro, principalmente en el hipocampo (concretamente en CA1) y áreas neocorticales específicas, dando lugar a problemas en el habla, la función ejecutiva y la memoria episódica entre otros (Androuin et al. 2018; Frere and Slutsky 2018). La neurodegeneración que ocurre en la EA es el resultado de varios factores, entre ellos la patología amiloide, la patología neurofibrilar y la neuroinflamación.

Se ha observado que existe acumulación de A β en el interior de las neuronas, y que el A β intraneuronal podría preceder a la formación de las placas amiloides y podría participar en la formación de estas. El A β se genera de forma intracelular, en el retículo endoplasmático, la red trans-Golgi y los endosomas-lisomas. Esta acumulación de A β dentro de las neuronas podría causar disfunción sináptica y muerte neuronal y, por consiguiente, déficit cognitivo. Concretamente, los oligómeros solubles de A β tendrían un papel fundamental en la neurotoxicidad, como se comentará en el [apartado 1.2.4](#) (Gouras et al. 2000; Zhang et al. 2011; Takahashi et al. 2017). No obstante, no está claro si los oligómeros de A β se agregan de forma intracelular o si los monómeros A β se secretan y agregan en forma de oligómeros en el medio extracelular.

La patología de Tau que ocurre en la EA también tiene un efecto neurotóxico, de hecho, existe una correlación entre la cantidad de oligómeros solubles de Tau y el nivel de deterioro cognitivo. La hiperfosforilación de Tau disminuye su afinidad por los microtúbulos, haciendo que estos se desensamblen y por tanto afectando al transporte axonal y dendrítico. La alteración del citoesqueleto neuronal da lugar a la formación de neuritas distróficas, que son engrosamientos de las prolongaciones neuronales debido a la acumulación de vesículas, mayoritariamente autofágicas. En las distrofias suele observarse una acumulación de APP, BACE1 y γ -secretasa. Las neuritas distróficas son características de la EA, son principalmente de naturaleza axonal y aparecen asociadas a las placas amiloides (Sanchez-Varo et al. 2012; Sadleir et al. 2016; LaFerla and Oddo 2005; D'Orange et al. 2018).

La neuroinflamación crónica que ocurre en la enfermedad de Alzheimer también contribuye a la neurodegeneración, ya que tanto los astrocitos reactivos como la microglía DAM liberan moléculas proinflamatorias que resultan neurotóxicas, como TNF α , óxido nítrico, IL-1 e IL-6. Además, como se mencionó en el [apartado 1.1.5](#), en la EA la microglía contribuye a la pérdida sináptica, ya que las sinapsis son marcadas por las moléculas del sistema del complemento para ser fagocitadas por la microglía (Rajendran and Paolicelli 2018; Li and Barres 2018).

1.2. PAPEL DEL A β Y LAS PLACAS AMILOIDES EN LA PATOLOGÍA

El péptido β -amiloide, que se genera por el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide ([ver apartado 1.1.3](#)), se acumula de forma exacerbada en el cerebro de las personas con la enfermedad de Alzheimer, siendo una de las principales marcas histopatológicas. Este péptido tiene propiedades tóxicas y tiende a agregarse, dando lugar a oligómeros solubles, oligómeros fibrilares y placas amiloides. En este apartado se revisarán las propiedades tóxicas de las formas solubles e insolubles de A β y su contribución a la progresión de la patología.

1.2.1. HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE E HIPÓTESIS ALTERNATIVAS

La hipótesis de la cascada amiloide ([Hardy and Higgins 1992](#)) ha sido el modelo más influyente en la investigación sobre la enfermedad de Alzheimer en los últimos 25 años aunque en la actualidad es materia de debate y controversia debido al continuo fallo terapéutico de las estrategias dirigidas al A β . Independientemente sigue siendo la más aceptada, y postula que la sobreproducción/agregación de A β es la causa inicial de la enfermedad de Alzheimer y provoca una cascada de eventos patológicos que llevan a la disfunción sináptica y a la muerte neuronal ([Hardy and Selkoe 2002](#)). Esta hipótesis se apoya en diversas evidencias, como el hecho de que todas las mutaciones de Alzheimer familiar se producen en los genes relacionados con la producción de A β (*APP*, *PS1* y *PS2*), lo cual sugiere que esta proteína juega un papel fundamental en la patología de la enfermedad. Por el contrario, las mutaciones en el gen de Tau no producen EA, sino demencia frontotemporal, en la cual se produce una patología neurofibrilar similar a la que ocurre en la EA, pero en ausencia de patología amiloide. Por tanto, la taupatía que ocurre en la EA sería de tipo secundario, consecuencia de las alteraciones desencadenadas por la patología amiloide ([Karran et al. 2011](#); [Woerman et al. 2016](#); [Scheltens et al. 2016](#)). Además, las personas con síndrome de Down, al expresar una mayor cantidad de APP debido a la trisomía en el cromosoma 21, suelen presentar una neuropatología similar a la observada en la EA a edades tempranas ([Goate et al. 1989](#); [Selkoe and Hardy 2016](#)). Por otro lado, los estudios de biomarcadores y PET (tomografía de emisión de positrones) revelan que la deposición de A β en el cerebro es el primer evento que ocurre, antes de que se produzca la acumulación de Tau hiperfosforilado, la pérdida sináptica y la muerte neuronal ([Karran and De Strooper 2016](#); [Selkoe and Hardy 2016](#)).

En condiciones no patológicas, el A β se produce de forma normal y es liberado al espacio extracelular, donde es rápidamente degradado o eliminado. En la enfermedad de Alzheimer, el inicio de la patología comienza debido a un aumento del A β en el cerebro, ya sea debido a mutaciones de Alzheimer familiar (*APP*, *PS1*, *PS2*) o debido a factores de riesgo de Alzheimer esporádico (envejecimiento, *APOE*, *TREM2*, *CLU*, *PICALM*). Estos factores de riesgo pueden provocar un aumento en la producción de A β , un incremento en la proporción de formas más largas e insolubles de A β (como A β_{42}), un fallo en los mecanismos de eliminación del A β o bien un plegamiento alternativo del A β ([Kametani and Hasegawa 2018](#); [Blennow et al. 2010](#); [Calero et al. 2015](#); [Karran and De Strooper 2016](#)). Se produciría por tanto un aumento en la acumulación de A β , que se agrega dando lugar a oligómeros solubles, que a su vez se

agregan para dar lugar a fibrillas insolubles que se depositan en el parénquima cerebral formando las placas amiloides. Estas placas amiloides están rodeadas de un halo de oligómeros solubles. Según la hipótesis de la cascada amiloide (figura 1.9), la patología amiloide daría lugar a una cascada de alteraciones que finalmente acaban manifestándose clínicamente en forma de demencia (Makin 2018). Los oligómeros solubles de A β , altamente tóxicos, dan lugar a fallos sinápticos e inducen vías de señalización que llevan a la hiperfosforilación de Tau, que se agrega y forma NFTs. A su vez, Tau tendría una influencia en la formación de A β , produciéndose un bucle de retroalimentación positiva. Todo esto da lugar a fallos en el transporte axonal y a la formación de neuritas distróficas alrededor de las placas amiloides. Además, la acumulación de A β hace que se produzca una respuesta inflamatoria mediada por la microglía y la astrogía, que a su vez genera un aumento del estrés oxidativo. Todas estas alteraciones acaban produciendo una muerte neuronal masiva que da lugar a la demencia (Bloom 2014; Blennow et al. 2010; Selkoe and Hardy 2016).

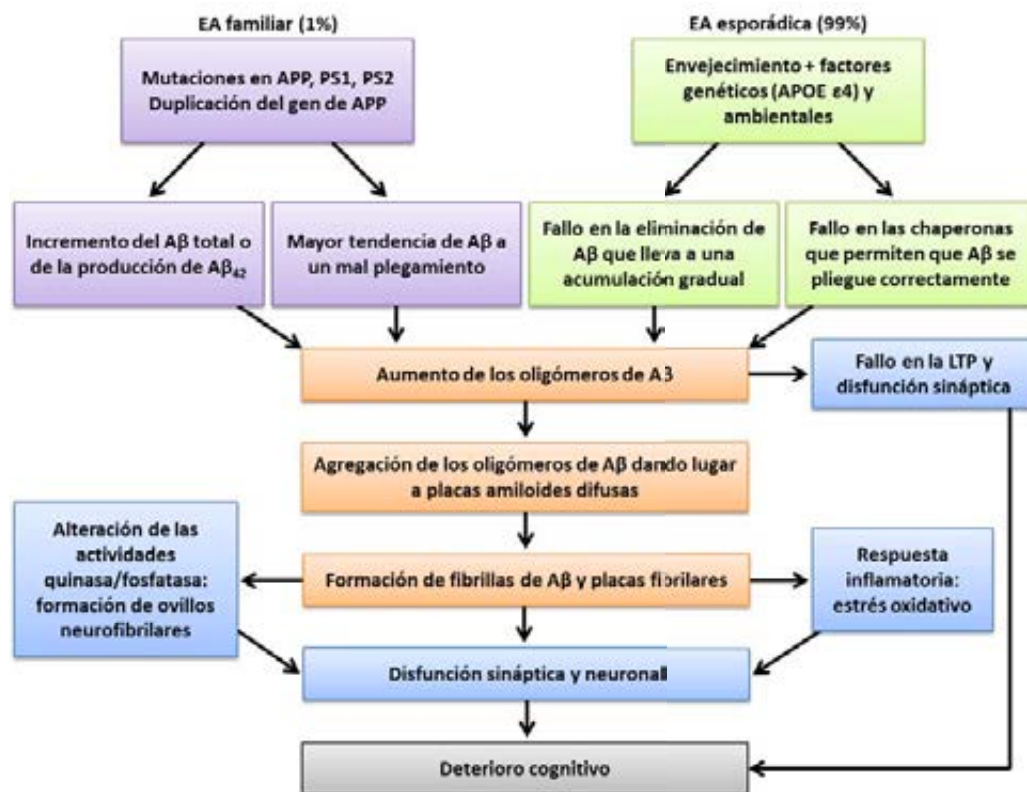


Figura 1.9. Hipótesis de la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer. El aumento en la producción total de A β o en la ratio A β ₄₂/A β ₄₀, así como fallos en los mecanismos de eliminación y plegamiento del A β , llevarían a una cascada patológica denominada cascada amiloide. La acumulación de A β daría lugar a la formación de NFTs, neuroinflamación, daño sináptico y muerte neuronal, provocando deterioro cognitivo. Modificado de Blennow et al. 2010.

Hay varios argumentos en contra de la hipótesis de la cascada amiloide. Por un lado, está el hecho de que en los modelos animales con mutaciones de Alzheimer familiar no se forman ovillos neurofibrilares, ni mimetizan todos los eventos que se describen en la cascada amiloide. Además, en los pacientes, la aparición de placas y la formación de ovillos siguen progresiones espacio-temporales diferentes (Herrup 2015; Karran and De Strooper 2016; Kametani and Hasegawa 2018). Por otra parte, en cerebros de personas de edad avanzada se

ha observado la presencia de placas amiloides sin que hubiese deterioro cognitivo. Además, los ovillos neurofibrilares correlacionan mejor con los síntomas que la carga amiloide. Para explicar esto, se ha propuesto que no todas las placas tienen la misma toxicidad, y que los oligómeros solubles son los agentes tóxicos en la EA. Aunque no existe correlación entre el deterioro cognitivo y la carga amiloide, sí existe correlación entre los niveles de oligómeros solubles y el declive cognitivo (Nelson et al. 2012; Makin 2018). Por otro lado, la mayoría de las estrategias terapéuticas contra la enfermedad de Alzheimer han tenido como diana el péptido A β . El fracaso de estas aproximaciones terapéuticas ha llevado a poner en entredicho la hipótesis de la cascada amiloide. No obstante, es posible que los tratamientos se estén aplicando demasiado tarde como para detener o revertir el daño neuronal. Actualmente se están realizando ensayos clínicos en personas con alto riesgo de desarrollar EA pero que aún no presentan los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, al tratarse de una enfermedad tan compleja, es posible que el camino sean las terapias multidiana (Makin 2018; Yuksel and Tacal 2019).

Desde que fue formulada, la hipótesis de la cascada amiloide ha sido modificada, dando un mayor peso al papel de los oligómeros solubles de A β frente a las placas amiloides, y actualmente sigue siendo la más aceptada. No obstante, ante la polémica con respecto a esta hipótesis, han surgido ideas alternativas como la hipótesis neuroinflamatoria, la hipótesis de Tau, la hipótesis de la cascada mitocondrial, la hipótesis metabólica y la hipótesis vascular (ver revisión Karran and De Strooper 2016). Entre ellas, la más popular en los últimos años es la hipótesis neuroinflamatoria. Esta se apoya en los estudios genéticos en humanos que han permitido identificar polimorfismos en genes expresados por la microglía (*TREM2*, *CR1*, *CD33*) como factores de riesgo para el desarrollo de Alzheimer de tipo esporádico. La hipótesis neuroinflamatoria sugiere que la disfunción microglial podría ser el factor que causa el inicio de la EA. Según esta hipótesis, la presencia de ciertos polimorfismos en genes expresados por la microglía disminuiría la capacidad fagocítica de estas células, por tanto se acumularía más A β en el cerebro (Yuan et al. 2016). Además, en estadios más avanzados de la enfermedad, la microglía se activa liberando citoquinas proinflamatorias y radicales libres que producen estrés oxidativo, y todo ello acaba produciendo muerte neuronal. La microglía también tiene un papel beneficioso, ya que se encarga de eliminar restos celulares y los acúmulos de A β mediante fagocitosis. Por tanto, la modulación de la microglía favoreciendo la fagocitosis en lugar de la liberación de moléculas inflamatorias citotóxicas podría ser una importante diana en el tratamiento de la EA (Makin 2018).

1.2.2. EL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE Y SU ELIMINACIÓN

El péptido A β , como se ha mencionado en el apartado 1.1.3, se genera por el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) por la vía amiloidogénica. La formación de A β ocurre principalmente en los compartimentos celulares ácidos (endosomas/lisosomas, retículo endoplasmático, trans-Golgi), ya que β -secretasa, necesaria en la ruta amiloidogénica, se encuentra principalmente en *rafts* de membrana en estos orgánulos. Se ha observado que A β se acumula en el aparato de Golgi, desde donde sigue la vía secretora, llegando al espacio extracelular mediante transporte vesicular (Arbor et al. 2016; Takahashi et al. 2017; Yuksel and Tacal 2019).

El A β resultante del procesamiento de APP puede tener una longitud variable, aunque las especies principales son las de 40 y 42 aminoácidos (A β ₄₀ y A β ₄₂). A β ₄₂ tiene una mayor hidrofobicidad y tendencia a formar fibrillas, por tanto, tiene una mayor toxicidad que A β ₄₀, pese a que A β ₄₂ supone solo un 5-10% del A β total que se produce. La enfermedad de Alzheimer, está muy asociada al aumento relativo de los niveles de A β ₄₂ con respecto a A β ₄₀ (MacLeod et al. 2015; Gouras et al. 2000; Zhang et al. 2011; Kametani and Hasegawa 2018; Yuksel and Tacal 2019). A partir del A β ₄₂ se pueden formar una gran variedad de especies truncadas, isomerizadas y/o fosforiladas (Selkoe and Hardy 2016).

El péptido A β es un producto de APP que se genera en las neuronas de forma fisiológica, así como en otros tipos celulares (Masters et al. 2015). En condiciones no patológicas, niveles bajos de A β incrementan la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo (Zhang et al. 2011). Además, A β podría ser una proteína antimicrobiana, protegiendo contra infecciones, ya que se uniría a los microorganismos y se agregaría alrededor de estos formando oligómeros y fibrillas, dejando atrapado al agente patógeno, en un proceso similar a la formación de placas amiloides (Kumar et al. 2016). Además, se ha visto que con la edad aumenta el estrés oxidativo, produciéndose daño mitocondrial, lo cual parece provocar un aumento en la deposición de A β . Esta acumulación de A β podría tener como fin reducir el estrés oxidativo. De hecho, se ha observado que A β se une fuertemente al cobre, evitando que este catalice la producción de radicales libres que contribuyen al estrés oxidativo. No obstante, niveles elevados de A β , asociados con la edad avanzada y la enfermedad de Alzheimer, llevan a la formación de oligómeros y placas amiloides y resultan neurotóxicos (Makin 2018).

Una importante vía de eliminación del A β es su internalización y degradación a través de las células gliales (microglía y astrocitos). Esta internalización puede ocurrir a través de pinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por receptores como SRs (receptores *scavenger*), TLRs (receptores *toll-like*), FcRs (receptores Fc) y LRPs (Ries and Sastre 2016). Una vez en el interior de la célula, el A β puede ser degradado por distintas vías (enzimas proteasas, vía endosomal/lisosomal, vía ubiquitina/proteasoma, autofagia). Las principales enzimas proteasas degradadoras de A β , la mayoría de ellas producidas por la glía, son la neprilisina (NEP), la enzima degradadora de insulina (IDE), la enzima convertidora de endotelina (ECE), la enzima convertidora de angiotensina (ACE), los activadores de plasminógeno, las metaloproteinasas de la matriz 2 y 9 (MMP2 y MMP9), la catepsina B y la catepsina D. Algunas de estas enzimas actúan solo sobre monómeros y oligómeros, mientras que otras pueden actuar también sobre formas fibrilares. Algunas ejercen su función en el interior de la célula, otras son secretadas al parénquima nervioso y actúan sobre el A β extracelular (Zhao et al. 2018a; Karran et al. 2011; Ries and Sastre 2016).

Otra vía de eliminación del A β es a través de la barrera hematoencefálica, yendo a la circulación sanguínea. En este proceso intervienen proteínas que se unen al A β , como APOE, APOJ, PICALM y α 2-macroglobulina. Estas proteínas, además de modular la formación de fibrillas, se unen al A β y forman un complejo que es internalizado a través de varios receptores, como LRPs (*low density lipoprotein receptor-related proteins*), LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad) y VLDLR (receptor de lipoproteínas de muy baja densidad). Estos receptores se localizan en los astrocitos y en el lado abluminal de las células del

endotelio cerebral, permitiendo por tanto la fagocitosis y degradación intracelular del A β por parte de los astrocitos y el transporte del A β a través de la barrera hematoencefálica hacia la circulación periférica. En el caso de APOE, la eficiencia en la eliminación de A β dependería de la isoforma de APOE, siendo la isoforma más eficiente APOE2 y la menos eficiente APOE4 (Liu et al. 2017; Zhao et al. 2015; Ries and Sastre 2016; Selkoe and Hardy 2016; Zhao et al. 2018a).

Además, el A β puede ser eliminado desde el fluido intersticial hacia el líquido cefalorraquídeo, aunque esta vía parece ser minoritaria, suponiendo solo un 10% de la eliminación del A β (Karran et al. 2011; Zhao et al. 2018a).

1.2.3. AGREGACIÓN Y PROPAGACIÓN DE A β

Una de las hipótesis para explicar la propagación de la patología defiende que las formas de A β con un plegamiento alternativo pueden actuar como semillas que se propagan por el cerebro e inducen que las proteínas nativas también se plieguen de forma patológica. Este mecanismo fue descrito por primera vez en la proteína priónica (Prusiner 1982), la cual actúa como un agente proteico infeccioso. Los priones reclutan proteínas con conformación nativa (PrP^C) y facilitan la conversión a un plegamiento alternativo que causa enfermedad (PrP^{Sc}). Aunque se trata de la misma proteína, la forma nativa y la forma patológica difieren en conformación. La proteína normal es rica en contenido α -hélice y presenta poco contenido en lámina- β , mientras que en la proteína patológica ocurre justo lo contrario (Colby and Prusiner 2011). Tras el descubrimiento de la proteína priónica, se fue abriendo paso la posibilidad de que en otros desórdenes de conformación proteica ocurriese un proceso similar en el cual proteínas funcionales con un plegamiento nativo adquieran un plegamiento alternativo favoreciendo su acumulación e induciendo la adquisición de una conformación patológica. Se ha sugerido que esto ocurre en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer, entre otras, puesto que todas ellas se caracterizan por la acumulación de agregados proteicos de distinto tipo (α -sinucleína, huntingtina, A β y fosfo-Tau), todos ellos con conformación rica en contenido lámina- β , al igual que PrP^{Sc} (Lee et al. 2010; Victoria and Zurzolo 2017). Se ha sugerido que todas estas proteínas podrían agruparse dentro de los términos “proteínas parecidas a priones”, “prionoides” o “propagones”, puesto que comparten características conformacionales con los priones y además tienen la capacidad de autopropagación a través de la inducción del plegamiento alternativo de sus respectivas proteínas con plegamiento nativo (Prusiner 2013; Eisele and Duyckaerts 2016).

En la enfermedad de Alzheimer, aunque existen evidencias de la acumulación intraneuronal del A β , la mayor parte de este se acumula de forma extracelular. Aún no está claro si la agregación de A β comienza intracelular o extracelularmente. En cuanto a su estructura tridimensional, el A β no adquiere una única conformación, sino que existen multitud de conformaciones. Al igual que ocurre con PrP, los monómeros de A β nativos suelen tener una estructura de α -hélice principalmente. Sin embargo, las proteínas con plegamiento alternativo presentan una estructura rica en lámina- β , con una mayor tendencia a agregar. Cada péptido A β puede unirse con otro péptido a través de la lámina- β y formar dímeros. A partir de ahí se van agregando más monómeros de A β hasta formar oligómeros, que a su vez se agregan y dan lugar a protofibrillas, fibrillas y placas amiloides (Moreno-Gonzalez and Soto 2011; Eisele and Duyckaerts 2016; Arbor et al. 2016; Yuksel and Tacal 2019). Según la hipótesis

de la propagación por semillas (*seeding*), el A β con plegamiento alternativo tiene la capacidad de servir como molde para que el A β con conformación nativa se pliegue también de forma alternativa y acelerar la agregación del A β (figura 1.10). Al contrario a lo que ocurre con los priones, no se ha observado que las semillas de A β sean infecciosas y se propaguen entre organismos, pero sí tendrían la capacidad de propagarse de célula a célula (Bloom 2014; Morales et al. 2015b; Eisele and Duyckaerts 2016; Olsson et al. 2018). Diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* apoyan la teoría de que tanto Tau como A β se propagan de forma similar a los priones en un proceso denominado propagación mediante semillas (*seeding*) (Morales et al. 2012; Duran-Aniotz et al. 2013; Fritsch et al. 2014b; Stancu et al. 2015; Usenovic et al. 2015; Kaufman et al. 2016; Wang et al. 2017b; Woerman et al. 2016; Olsson et al. 2018).

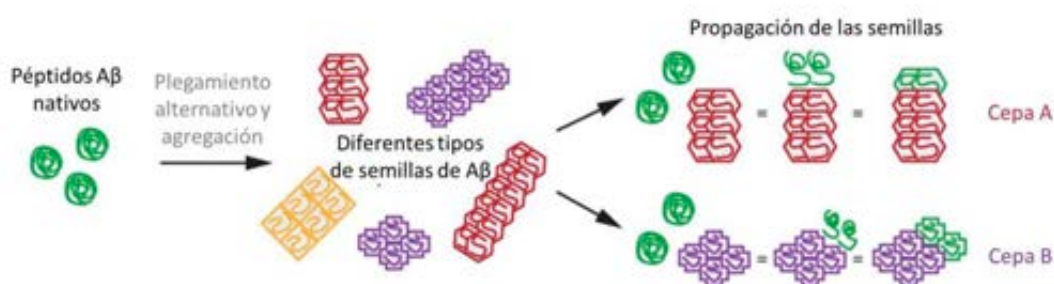


Figura 1.10. Hipótesis de la propagación de A β mediante semillas. El A β puede plegarse de forma alternativa y dar lugar a semillas (*seeds*). Estas tienen la capacidad de propagarse intra y extracelularmente e inducir el plegamiento alternativo en otras proteínas de A β con conformación nativa. Modificado de Eisele and Duyckaerts 2016.

1.2.4. OLIGÓMEROS SOLUBLES Y SU TOXICIDAD

Los oligómeros solubles de A β son agrupaciones pequeñas de monómeros que están presentes en la fracción soluble de extractos de tejido cerebral de pacientes con EA. Normalmente tienen un rango de entre 2 y 24 monómeros. Los oligómeros solubles de A β se han detectado tanto extracelularmente como en el interior de las células (Viola and Klein 2015; Moreno-Gonzalez and Soto 2011). La caracterización y clasificación de los distintos tipos de oligómeros solubles es complicada, puesto que existe una gran diversidad: dímeros, trímeros, tetrámeros, A β *56 (nonámeros y dodecámeros), ADDLs (ligandos difusibles derivados de A β), oligómeros anulares, etc. Tampoco existe un consenso en cuanto a qué formas oligoméricas son más tóxicas. No obstante, los oligómeros solubles de A β pueden clasificarse en dos tipos según su relación con las placas amiloides. Los oligómeros tipo 1 (prefibrilares y reconocidos por el anticuerpo A11) no estarían relacionados con las placas amiloides y tendrían una mayor capacidad neurotóxica, mientras que los oligómeros tipo 2 (fibrilares y reconocidos por el anticuerpo OC) estarían alrededor de las placas amiloides y no tendrían tanta toxicidad (Liu et al. 2015). Los oligómeros de A β también pueden clasificarse según su tamaño en oligómeros de bajo peso molecular (dímeros, trímeros y tetrámeros) y de alto peso molecular, teniendo una mayor toxicidad los de bajo peso molecular (Sakono and Zako 2010; Forner et al. 2017).

El mecanismo molecular por el cual el A β produce neurotoxicidad aún no está claro. Se ha observado que existe una correlación entre los niveles de oligómeros solubles y el declive cognitivo, mientras que no hay correlación entre la carga amiloide y los síntomas de los

pacientes. Por ello se ha propuesto que los oligómeros solubles de A β son mucho más tóxicos que las formas fibrilares. Concretamente, los oligómeros de A β_{42} tienen mayor toxicidad y disminuyen la función y el número de sinapsis, alterando también la estructura sináptica (espinas dendríticas). Estas alteraciones llevan a una inhibición de la LTP, y por tanto, disminuyen la plasticidad sináptica (Shankar et al. 2008; Bloom 2014; Selkoe and Hardy 2016; Takahashi et al. 2017; Makin 2018).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la toxicidad de los oligómeros solubles de A β . Uno de ellos es la unión de los oligómeros a receptores de NGF (factor de crecimiento nervioso), alterando la cascada de señalización mediada por NGF y desencadenando apoptosis. Por otro lado, algunas formas oligoméricas de A β se unirían a receptores postsinápticos, alterando la homeostasis del calcio y llevando a un aumento del estrés oxidativo y a una pérdida sináptica (Sakono and Zako 2010). Se ha visto además que los oligómeros de A β activarían vías de señalización que desencadenan la hiperfosforilación de Tau. Los oligómeros de A β se unen al receptor Frizzled inhibiendo la vía de señalización de Wnt, lo cual lleva a la activación de la enzima GSK-3 β y a la hiperfosforilación de Tau (Sakono and Zako 2010; Bloom 2014). Otro de los mecanismos de toxicidad de los oligómeros solubles es la formación de poros en la membrana de las neuronas. Estos poros están formados por 3-6 monómeros de A β y a través de ellos habría un flujo de Ca $^{2+}$ hacia el citosol. El Ca $^{2+}$, que se encuentra a una concentración mucho mayor en el retículo endoplasmático, actúa como segundo mensajero para regular el potencial de membrana, la excitabilidad, la plasticidad sináptica y la memoria. El aumento del Ca $^{2+}$ citosólico debido a los poros de A β hace que aumente la liberación de Ca $^{2+}$ desde el RE hacia el citosol, lo cual activa una serie de vías que llevan a la apoptosis (Arbor et al. 2016). Los mecanismos de toxicidad intracelular de los oligómeros de A β aún no se conocen bien. Se ha propuesto que la interacción de los oligómeros de A β con el proteasoma causaría una disfunción de este y llevaría a la acumulación de A β y Tau hiperfosforilado y a la muerte celular (Sakono and Zako 2010).

1.2.5. PLACAS AMILOIDES Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El péptido β -amiloide tiene una gran capacidad de agregación, dando lugar a oligómeros solubles, oligómeros fibrilares y placas amiloides, formadas principalmente por A β_{40} y A β_{42} . La acumulación de placas amiloides o seniles en el parénquima nervioso es una de las principales marcas histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer (Yuksel and Tacal 2019). En este apartado se revisarán las propiedades de las placas amiloides y su contribución a la progresión de la patología.

Existe una gran diversidad en la clasificación de las placas amiloides, según su composición, su forma y si están rodeadas o no de neuritas distróficas. No obstante, se pueden clasificar en dos tipos principales (figura 1.11) (Perl 2010; Eisele and Duyckaerts 2016; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018):

- Placas neuríticas: presentan un núcleo denso y fibrilar, denominado core, con morfología esférica o estrellada, que se tiñe con rojo Congo y Tioflavina. Dicho core está rodeado de un halo de oligómeros solubles de A β . En el halo además hay neuritas distróficas, la mayoría axonales, en las cuales se acumulan Tau y APP. En el halo

también hay astrocitos reactivos y microglía activada. La microglía suele situarse en contacto con el core fibrilar, mientras que la astroglia se encuentra más alejada y envía sus prolongaciones rodeando a la placa.

- Placas difusas: no son fibrilares, por tanto, no presentan un core denso y no se tiñen con rojo Congo ni Tioflavina. Tampoco presentan neuritis distróficas ni glía activada a su alrededor. Este tipo de placas no tiene un límite definido. Las placas difusas suelen verse en personas de edad avanzada que no presentaban deterioro cognitivo.

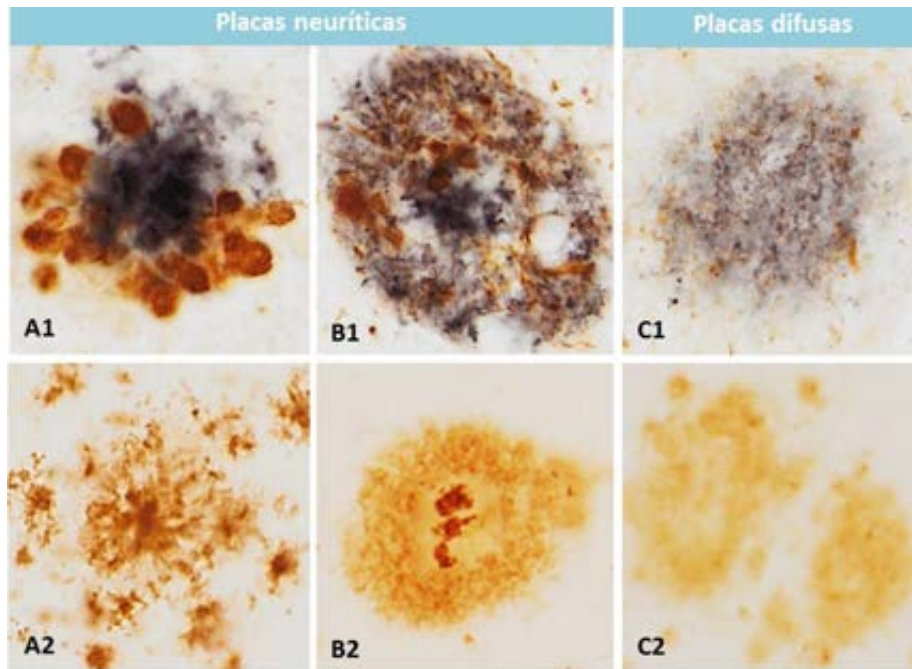


Figura 1.11. Tipos de placas seniles. En A1 y A2 se muestran placas neuríticas de tipo fibrilar (o placas primitivas), mientras que B1 y B2 corresponden a placas clásicas, con un core denso compuesto principalmente por $A\beta_{42}$ y un halo difuso que lo rodea. Por otro lado, las placas difusas no provocan la aparición de neuritis distróficas (C1) y además presentan una morfología indefinida o difusa (C2). Inmunohistoquímica doble (A1-C1) para $A\beta$ (negro) y fosfo-tau (marrón) e inmunotinción simple para $A\beta_{42}$ (A2-C2). Tomado de [Sanchez-Mejias \(2015\)](#).

Las placas amiloides pueden acumularse tanto en el espacio extracelular, formando depósitos parenquimales, como en las paredes de los vasos sanguíneos, dando lugar a la angiopatía amiloide cerebral (AAC). Los depósitos parenquimales están formados principalmente por $A\beta_{42}$, mientras que los depósitos vasculares están compuestos mayoritariamente por $A\beta_{40}$, que es más soluble ([Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018](#)). Los niveles de $A\beta_{42}$, que es más hidrofóbico y con mayor tendencia a la agregación, son de importancia en el inicio de la formación de las placas amiloides, mientras que $A\beta_{40}$ parece prevenir que comience la formación de estas ([Karran et al. 2011](#)).

Las placas amiloides han sido el eje central de la hipótesis clásica de la cascada amiloide y de la investigación de terapias contra la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el fracaso de estas terapias y el hecho de que la carga amiloide no correlaciona con el deterioro cognitivo ha puesto en entredicho la importancia de estas lesiones en la progresión de la patología. Hoy en día se sabe que los oligómeros solubles de $A\beta$, cuyos niveles sí correlacionan

con los síntomas en pacientes, tienen mucha mayor neurotoxicidad que las placas amiloides. Estas formas oligoméricas pueden estar asociadas a las placas amiloides, ya que las placas de tipo fibrilar presentan un halo de oligómeros solubles de A β , y en dicho halo la densidad sináptica es más baja, aumentando el número de sinapsis conforme aumenta la distancia respecto a la placa (Koffie et al. 2009; Arbor et al. 2016; Makin 2018).

Teniendo en cuenta que los oligómeros solubles son la forma más tóxica del A β , las placas podrían tener un efecto protector, al secuestrar dichos oligómeros y contenerlos en una forma menos tóxica, evitando que produzcan muerte neuronal. Por tanto, las placas al principio de la patología podrían tener un papel protector (Arbor et al. 2016; Makin 2018). Apoyando esta idea, en modelos animales se ha observado que los oligómeros solubles A β ₄₂ aislados de pacientes causaban disfunción y pérdida sináptica, mientras que los núcleos (core) de las placas amiloides aislados de esos mismos pacientes no afectaban a la función sináptica. Sin embargo, si estos núcleos eran desnaturalizados, los oligómeros que eran liberados por dichos núcleos sí disminuían la LTP (Shankar et al. 2008).

Además, en estudios *post mortem* se ha observado que hay personas sin demencia con una densidad de placas similar a los pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Estos casos se han denominado controles con alta patología. El estudio de estos casos ha revelado que, aunque la densidad de placas era similar a los casos con Alzheimer, los controles con alta patología tenían una cantidad de oligómeros de A β mucho menor. Por tanto, las placas de estas personas no dementes tendrían una menor cantidad de oligómeros a su alrededor. Las placas estarían secuestrando los oligómeros solubles, hasta que llegaría un punto en el cual llegan a su límite físico y empiezan a liberar los oligómeros solubles, que difunden causando sinaptotoxicidad (Esparza et al. 2013; Hong et al. 2014). El hecho de que la acumulación y propagación de las placas amiloides en el cerebro de los pacientes ocurra décadas antes del inicio de los síntomas apoya la idea de que dichas placas tendrían un papel protector al principio de la patología (Venegas et al. 2017).

Estas evidencias sugieren que las placas amiloides son estructuras dinámicas que cambian con la progresión de la patología, y que no todas las placas tienen las mismas propiedades tóxicas. La modulación de estas propiedades de las placas favoreciendo su compactación y evitando la liberación de oligómeros solubles hacia el parénquima cerebral sería una interesante estrategia terapéutica.

1.3. RELACIÓN DE LA MICROGLÍA CON LA PATOLOGÍA AMILOIDE

Las células microgliales, cuyas características generales se han tratado en el **apartado 1.1.5**, son los macrófagos residentes del SNC y coordinan la respuesta inmune innata ante la presencia de patógenos o lesiones en el parénquima cerebral. En la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de A β en forma de placas amiloides va acompañada de una activación de la respuesta inmune innata en la cual participa la microglía activada, que rodea a las placas amiloides. Gracias a los estudios de GWAS se sabe que muchos de los componentes de la

respuesta inmune innata y de la cascada del complemento son factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer y, por tanto, que la microglía tiene una gran importancia en el desarrollo de la enfermedad. No obstante, el papel concreto de la microglía en la progresión de la patología aún no está claro. Se desconoce si su función es beneficiosa pero insuficiente, o si la microglía es eficiente en estadios tempranos de la enfermedad pero luego pierde su eficacia o incluso se vuelve perjudicial (Serrano-Pozo et al. 2013; Calero et al. 2015; Selkoe and Hardy 2016; Venegas et al. 2017; Keren-Shaul et al. 2017; Webers et al. 2019).

La microglía activada que se localiza alrededor de las placas amiloides parece ser una subpoblación específica, la cual tiene una expresión diferencial de genes (sobreexpresión de *TREM2*, *DAP12* y *APOE* entre otros) con respecto a la microglía interplaca, que está en estado homeostático. Esta microglía alrededor de las placas presenta un patrón transcripcional denominado DAM (ver apartado 1.1.5), que es común a diversas enfermedades neurodegenerativas. Muchos de los genes relacionados con la activación DAM se han identificado además como factores de riesgo de la EA. La activación DAM se caracteriza por un aumento del metabolismo lipídico y lisosomal y de la fagocitosis, lo cual sugiere que la microglía alrededor de las placas amiloides trata de fagocitar y eliminar el A β . En la microglía DAM, *TREM2*, junto con *DAP12*, estimula y mantiene el estado fagocítico de la microglía, además de inhibir la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias. *APOE*, que también se sobreexpresa en la microglía DAM, se une al A β , interacciona con *TREM2* y facilita la fagocitosis del A β por parte de la microglía (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017; Hansen et al. 2018; Henstridge et al. 2019). La variante R47H de *TREM2*, que confiere un mayor riesgo de desarrollar la EA, conllevaría una pérdida de función en la microglía, una menor capacidad fagocítica. En modelos animales, la eliminación de uno de los alelos de *TREM2* provoca una disminución del número de células microgliales alrededor de las placas amiloides. Además, en modelos amiloidogénicos *knockout* para *TREM2* se ha observado una mayor acumulación de placas amiloides a edades avanzadas (Ulrich et al. 2014; Ulland and Colonna 2018; Hansen et al. 2018; Carmona et al. 2018; Parhizkar et al. 2019). Por otro lado, la sobreexpresión de *TREM2* producía una disminución de la carga amiloide, de la neuroinflamación, de la pérdida sináptica y del déficit cognitivo (Jiang et al. 2014b). Estas evidencias apoyan un papel fagocítico de la DAM microglía y *TREM2* en la enfermedad de Alzheimer, que sería beneficioso (Yeh et al. 2017; Zhao et al. 2018b).

Por contra, también existe la visión de que la microglía que rodea a las placas amiloides actúa meramente como un agente aislante, tratando de confinar la toxicidad del A β . Esto se ve apoyado por experimentos en modelos animales amiloidogénicos en los que la depleción de la microglía y la inhibición de la activación microglial han tenido poco efecto sobre la formación y el mantenimiento de las placas amiloides. No obstante, es posible que para observar un efecto sobre las placas amiloides sea necesario la depleción microglial durante tiempos más prolongados. De hecho, en otros experimentos sí se ha obtenido una fuerte disminución en la formación de placas debido a la depleción de la microglía (Grathwohl et al. 2009; Olmos-Alonso et al. 2016; Spangenberg and Green 2017; Li and Barres 2018; Spangenberg et al. 2019). Se piensa que la barrera microglial que se forma alrededor de las placas podría promover la formación, agregación y compactación de las fibras amiloides, tratando de evitar la liberación de formas oligoméricas más tóxicas hacia el parénquima

cerebral, y por tanto reduciendo la formación de distrofias axonales (Sosna et al. 2018; Spangenberg et al. 2019). La compactación del A β en un core denso en las placas amiloides requeriría de APOE y sería promovida por TREM2, siendo un mecanismo protector que limita la neurotoxicidad de los depósitos amiloides. En modelos animales *knockout* para TREM2 y en pacientes portadores de la variante R47H de TREM2 esta barrera microglial se ve reducida (Condello et al. 2015; Wang et al. 2016; Yuan et al. 2016; Mazaheri et al. 2017; Hansen et al. 2018).

Otro mecanismo que se ha propuesto para explicar el papel de la microglía en la compactación de las placas amiloides son los denominados ASC *specks*. La microglía periplaca se activa y produce una gran cantidad moléculas proinflamatorias, algunas de las cuales se agregan dando lugar a complejos denominados inflamasomas. Se ha descrito que tanto en el cerebro de pacientes con EA como en modelos animales ocurre la activación del inflamasoma NLRP3, liberándose sustancias proinflamatorias como la IL-1 β . Además de esto, NLRP3 parece contribuir a la propagación y progresión de la patología amiloide. Tras la activación de NLRP3, este reclutaría a la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) y esto promovería la fibrilación de ASC y el ensamblaje de estas fibrillas dando lugar a la formación de ASC *specks*. La liberación de ASC *specks* también tendría un efecto proinflamatorio sobre la microglía y además podría favorecer la agregación de A β , actuando como semillas. Ocurriría una retroalimentación positiva en la cual el A β promueve la inflamación, y la inflamación a su vez promueve la formación de nuevas placas amiloides (Venegas et al. 2017; Hoss et al. 2017; Abbott 2018; Webers et al. 2019).

La microglía podría jugar un doble papel en la enfermedad de Alzheimer. Por un lado, se ha descrito que la microglía DAM, con una elevada expresión de TREM2, tendría un papel beneficioso, ya que eliminaría A β y restos celulares mediante fagocitosis. Por otro lado, la presencia de las placas amiloides puede provocar una respuesta proinflamatoria en la microglía, que llevaría a la liberación de moléculas inflamatorias que causan daño neuronal. Aunque a la microglía DAM se le atribuyó inicialmente un papel protector, estudios recientes sugieren que también podría ser perjudicial (Krasemann et al. 2017; Hansen et al. 2018). En ratones amiloidogénicos deficientes en TREM2, la inducción de los genes *TNF* e *IL1 β* se ve disminuida. Por tanto, la activación de TREM2 en la DAM microglía promovería no solo la fagocitosis, sino también la activación de estos genes y la producción de moléculas inflamatorias que causarían neurotoxicidad (Wang et al. 2015; Jay et al. 2016). Se hacen necesarios más estudios para dilucidar si el perfil transcripcional dependiente de TREM2 es beneficioso o perjudicial.

Además, los agregados de A β pueden actuar como patrones moleculares asociados a enfermedad y estimular a receptores *toll-like* (TLR) y al inflamasoma NLRP3, dando lugar también a la producción de TNF α , IL-1 β y otras citoquinas inflamatorias (Venegas et al. 2017; Hansen et al. 2018; Webers et al. 2019). Apoyando la idea de que la inflamación clásica promueve la progresión de la patología en la EA, la delección de NLRP3 y receptores TLR disminuye la deposición de A β y el deterioro cognitivo en modelos animales amiloidogénicos (Heneka et al. 2015b). Además, en estadios avanzados de la enfermedad, se ha observado que aumenta la expresión de genes microgliales que inhiben la fagocitosis y promueven un fenotipo proinflamatorio, como los genes *CD33* y *CR1*, con lo que la microglía liberaría

moléculas proinflamatorias que causan neurotoxicidad y contribuyen a la progresión de la enfermedad y a la neurodegeneración (Grathwohl et al. 2009; Selkoe and Hardy 2016; Makin 2018; Hansen et al. 2018).

Otro de los posibles efectos perjudiciales de la microglía en la EA es que esta puede mediar directamente la pérdida sináptica. Como se mencionó en el [apartado 1.1.5](#), durante el desarrollo del sistema nervioso, la microglía fagocita sinapsis y participa en la remodelación de las conexiones sinápticas (poda sináptica) gracias a la acción del sistema del complemento. En la enfermedad de Alzheimer, la eliminación de sinapsis mediada por el sistema del complemento podría reactivarse. En muestras de pacientes con EA, se ha observado que existe una activación del complemento (C1q, C3 y C4) asociada a las placas amiloides y que durante el envejecimiento ocurre un aumento en los niveles de C1q, especialmente en el hipocampo (Zanjani et al. 2005; Stephan et al. 2013; Hansen et al. 2018). En modelos animales de la enfermedad de Alzheimer, se ha visto que el A β soluble puede inducir que las sinapsis hipocámpales sean marcadas por la molécula del complemento C1q, provocando que sean fagocitadas por la microglía a través del receptor CR3. Este fenómeno se ha observado antes de la aparición de las placas amiloides y contribuiría a la pérdida sináptica temprana. Una vez que aparecen las placas amiloides, la microglía las rodea y podría regular la pérdida sináptica alrededor de estas. En modelos animales amiloidogénicos, se ha observado que la depleción de la microglía protege contra la pérdida sináptica alrededor de las placas amiloides (Hong et al. 2016; Grathwohl et al. 2009; Olmos-Alonso et al. 2016).

La mayoría de los estudios para analizar el perfil transcripcional de la microglía se han realizado en modelos animales, sin embargo, la activación microglial en el hipocampo de modelos murinos amiloidogénicos es mucho mayor a la observada en muestras de pacientes. Esto podría deberse a que la cantidad de A β es mucho mayor en los modelos o bien a que ocurra una degeneración microglial con la progresión de la enfermedad en los pacientes. Se ha visto que esta degeneración en pacientes está asociada a los oligómeros solubles de Tau (Sanchez-Mejias et al. 2016; Navarro et al. 2018).

Posiblemente, la microglía siga una dinámica durante la progresión de la patología en la EA, teniendo un efecto protector al inicio (fagocitosis, contención de la toxicidad del A β en las placas amiloides) que sería insuficiente para frenar el avance de esta. Conforme avanza la patología, la microglía podría perder su función fagocítica y liberar moléculas proinflamatorias que contribuyen a la neurodegeneración. La importancia de la microglía en la progresión de la patología abre nuevas vías en la búsqueda de tratamientos, como la modulación de estas células para que realicen su función de eliminar los acúmulos de A β de forma más eficiente, evitando que adquieran un fenotipo neurotóxico, haciendo de esta forma que ayuden a paliar las lesiones de la enfermedad en lugar de contribuir a la progresión de la patología.

1.4. MODELOS MURINOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Gracias a los modelos animales, en las últimas décadas se ha producido un gran avance en el conocimiento de la enfermedad de Alzheimer. La investigación actual se basa principalmente en el uso de modelos animales, ya que, aunque estos no recapitulan la patología de la EA de forma completa, son de gran utilidad a la hora de estudiar los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la enfermedad en las etapas iniciales, buscar biomarcadores tempranos y realizar ensayos preclínicos. A pesar de esto, los tratamientos desarrollados en modelos animales han fallado al pasar a ensayos clínicos. Por tanto, aún no se ha desarrollado un tratamiento que retrase la aparición de la patología o frene la progresión de esta. Uno de los posibles motivos del fracaso en el desarrollo de fármacos es la ausencia de modelos animales que recapitulen todas las alteraciones que ocurren en los pacientes con EA. Además, los tratamientos deberían aplicarse cuando comienzan las alteraciones a nivel tisular, décadas antes del inicio de los síntomas. Sin embargo, la ausencia de biomarcadores tempranos y buenos métodos de diagnóstico precoz hace que los tratamientos se apliquen demasiado tarde, cuando ya se han iniciado los síntomas de deterioro cognitivo (Drummond and Wisniewski 2016; Dawson et al. 2018; Sasaguri et al. 2017).

Actualmente no existe ningún modelo animal que reproduzca todas las alteraciones patológicas que ocurren en la enfermedad de Alzheimer (Dawson et al. 2018). A lo largo de los años se ha generado una gran variedad de modelos, la mayoría de ellos murinos, por lo que este apartado se centra en los ratones como modelo de la EA (AlzForum, <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>).

Mayoritariamente, los modelos animales actuales portan mutaciones que presentan los enfermos de Alzheimer familiar (Drummond and Wisniewski 2016). En humanos, simplemente con portar una mutación en los genes relacionados con la producción de A β (*APP*, *PS1* y *PS2*) se desarrolla la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, en los modelos animales, las mutaciones de Alzheimer familiar por sí solas no bastan para que se desarrolle la patología al completo: placas amiloides, ovillos neurofibrilares, neuroinflamación y pérdida neuronal y sináptica. Esto puede deberse a que la respuesta neuroinflamatoria difiere entre el ser humano y el ratón. Los modelos basados en mutaciones en *APP* (denominados modelos amiloidogénicos) suelen tener una acentuada patología amiloide, pero no presentan ovillos neurofibrilares. Pese a que no se han identificado mutaciones el gen *MAPT* (que codifica la proteína Tau) que causen EA, se han generado ratones con mutaciones en este gen para poder obtener modelos que reproduzcan la patología neurofibrilar (Van Dam and De Deyn 2011).

Los animales transgénicos para *APP* presentan un aumento del A β total o bien un aumento en la producción de A β_{42} que lleva a la acumulación de placas amiloides, sin embargo, los modelos *PS1* no suelen presentar depósitos amiloides, aunque el procesamiento del APP endógeno de ratón se vea alterado. No obstante, en modelos bigénicos la combinación de mutaciones en *APP* y *PS1* provoca una aceleración drástica en la patología amiloide en

comparación con los modelos monogénicos para *APP*. Estos modelos suelen presentar también neuritas distróficas y gliosis pero no presentan NFTs (Dawson et al. 2018).

Uno de los modelos que se ha empleado en esta Tesis Doctoral es el doble transgénico *APP*_{751SL}/*PS1*_{M146L}, que sobreexpresa la mutación M146L en el gen *PS1* bajo el promotor HMG-CoA reductasa y también sobreexpresa la isoforma 751 de *APP* con las mutaciones sueca (K670N/M671L) y londinense (V717I) bajo el promotor Thy-1 (Blanchard et al. 2003). Este modelo tiene una gran ventaja respecto a otros modelos animales, ya que se produce una muerte neuronal selectiva de interneuronas GABAérgicas a partir de los 4-6 meses, así como muerte de neuronas piramidales en el hipocampo a edades tempranas (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014). Además, este modelo presenta placas amiloides a partir de los 3-4 meses, preferentemente en el subículo, el hipocampo y la corteza entorrinal (Caballero et al. 2007; Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014). Este doble transgénico también presenta una marcada respuesta inflamatoria, con astrogliosis y microgliosis, desde los 4-6 meses de edad. No presenta ovillos neurofibrilares, aunque sí presenta la proteína Tau hiperfosforilada (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014). La patología neurítica es principalmente de origen axonal y aparece a partir de los 4-6 meses de edad (Trujillo-Estrada et al. 2013; Sanchez-Varo et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014).

Por otro lado, surgieron los modelos trigénicos, puesto que era necesario tener modelos animales que presentaran la patología neurofibrilar (gracias a mutaciones en Tau) junto con una patología amiloide acelerada (combinando mutaciones en *APP* y *PS1*), tal como ocurre en la enfermedad de Alzheimer. El primer triple transgénico que apareció fue el 3xTgAD (Oddo et al. 2003), que presenta mutaciones en *APP* (mutación sueca K670N/M671L), en *PS1* (M146V) y en el gen de Tau *MAPT* (P301L) bajo el promotor Thy-1. Este modelo, que ha sido empleado en este trabajo, presenta deterioro cognitivo desde los 3-5 meses. En este transgénico primero ocurre la acumulación de A β intraneuronal, luego se acumula Tau hiperfosforilado, se forman placas amiloides extracelulares y finalmente ovillos neurofibrilares intraneuronales. Este modelo también desarrolla neuritas distróficas y pérdida sináptica, pero no ocurre muerte neuronal en el hipocampo.

Todos los modelos mencionados anteriormente se basan en mutaciones de Alzheimer familiar. Pese a que la forma esporádica de la enfermedad supone el 99% de los casos, actualmente existen pocos modelos esporádicos. Uno de los escasos modelos de Alzheimer esporádico, desarrollado recientemente en el laboratorio del Dr. Frank M. LaFerla, es el modelo hA β -KI, que porta la secuencia del A β humano no mutado dentro del gen *APP* de ratón, y que ha sido uno de los modelos empleados en esta Tesis Doctoral. Aunque los modelos transgénicos clásicos ya mencionados siguen siendo de gran utilidad en la investigación de la EA, las nuevas técnicas de edición genómica están permitiendo el desarrollo de nuevos modelos de Alzheimer esporádico. La técnica CRISPR/Cas9 permite la modificación genética de forma más rápida y menos costosa, permitiendo modificar varios genes de forma simultánea (Götz et al. 2018). La mejora de los modelos animales es una de las claves para un mayor éxito de los fármacos que pasan a ensayos clínicos.

1.5. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

En la actualidad, la cifra de personas con demencia a nivel mundial asciende a casi unos 50 millones, siendo la causa más común la enfermedad de Alzheimer. Debido al envejecimiento poblacional que se está produciendo en los países desarrollados, se prevé que esta cifra aumente dramáticamente en los próximos años, alcanzándose los 152 millones de afectados en 2050 ([World Alzheimer Report 2018](#), www.alz.co.uk/research/world-report-2018). Esto sitúa a la enfermedad de Alzheimer como un problema de salud de primer orden, siendo una de las enfermedades con un mayor coste sociosanitario. Aunque se sabe que se trata de una proteinopatía acompañada de neuroinflamación, pérdida sináptica y muerte neuronal, no se conocen los mecanismos que desencadenan el inicio y progreso de la patología. Tampoco existen fármacos actualmente que frenen el curso de la enfermedad o eviten la aparición de los síntomas. El fracaso de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, principalmente basados en la hipótesis amiloide, pone de manifiesto la existencia de mecanismos patogénicos implicados aún sin identificar. En los últimos años se ha producido un auge en la investigación del papel de la glía, principalmente la microglía, en el desarrollo de la enfermedad, abriendo la puerta a nuevas aproximaciones farmacológicas que tienen como diana la modulación de la función microglial. Pese a que las placas amiloides han tenido tradicionalmente un papel central en la enfermedad de Alzheimer y ha sido la diana principal los últimos 25 años en el desarrollo de terapias para modificar curso de la enfermedad, aún no se conoce realmente su origen ni implicación en el proceso neurodegenerativo.

Nuestro grupo de investigación, perteneciente al CIBER de enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III y al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), se centra desde hace años en el estudio a nivel celular y molecular de los mecanismos que subyacen a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer, con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas. Uno de nuestros principales objetivos es entender el papel de la respuesta neuroinflamatoria, y en concreto la implicación de la microglía activada y los astrocitos reactivos, en la patología Alzheimer. El principal modelo animal empleado por el grupo es el doble transgénico APP_{751SL}/PS1_{M146L} que, a diferencia de la mayoría de los modelos animales actuales, presenta muerte neuronal similar a la que ocurre en los pacientes. Este transgénico presenta acumulación extracelular de A β desde edades muy tempranas (3-4 meses) en el hipocampo y la corteza entorrinal, las regiones más vulnerables en esta patología. Al igual que en los pacientes, en este modelo la formación de placas induce una respuesta inflamatoria con activación microglial y astrogial, formación de neuritas distróficas de origen axonal/sináptico y muerte neuronal de poblaciones GABAérgicas y piramidales de la corteza perirrinal y entorrinal, y el hipocampo ([Ramos et al. 2006](#); [Jimenez et al. 2008, 2011](#); [Moreno-Gonzalez et al. 2009](#); [Baglietto-Vargas et al. 2010](#); [Sanchez-Varo et al. 2012](#); [Torres et al. 2012](#); [Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014](#); [Baglietto-Vargas et al. 2017](#); [Sanchez-Mejias et al., 2019](#)).

Una de las incógnitas en la EA es el papel de las placas amiloides en el desarrollo y progresión de la patología. En nuestro modelo, las placas fibrilares están rodeadas por un halo periférico de oligómeros de A β y una corona de neuritas distróficas (porciones axonales/presinápticas anormalmente dilatadas por acumulación de multitud de vesículas

autofágicas) al igual que en los pacientes. El número de distrofias asociadas a las placas aumenta con el tamaño de la placa, que a su vez aumenta con la edad (Jimenez et al. 2011; Torres et al. 2012; Sanchez-Varo et al. 2012). Aunque se ha considerado a las placas como almacenes inertes de A β , es posible que estas tengan la función de secuestrar las formas oligoméricas solubles de A β , evitando su toxicidad. Con la edad, las placas podrían cambiar sus propiedades y liberar formas oligoméricas tóxicas afectando a los axones/sinapsis cercanas. Por tanto, la modulación de las propiedades de las placas amiloides podría ser una interesante diana terapéutica. En ese sentido, nuestro grupo describió que el tratamiento con litio en el modelo APP/PS1 daba lugar a placas más pequeñas, más compactas y menos tóxicas, evitando la pérdida neuronal en el hipocampo y la corteza entorrinal (Trujillo-Estrada et al. 2013).

Las placas inducen una fuerte activación microglial y astrogial a su alrededor. El papel de la activación microglial está siendo objeto de numerosos estudios en relación con la respuesta neuroinflamatoria y su doble perfil protector/perjudicial. Los recientes estudios transcriptómicos han identificado una firma molecular de la microglía activada asociada con los procesos neurodegenerativos (microglía DAM). Sin embargo, no es bien conocida la relación funcional de la microglía DAM con las placas amiloides. La microglía podría actuar limitando la propagación de la patología amiloide, mediante la agregación/compactación o aislamiento de las placas, regulando así su toxicidad, o por el contrario, promoviendo su dispersión, aunque ambas funciones podrían tener lugar dependiendo del contexto temporal o espacial. Tampoco se sabe si existen distintos fenotipos de microglía activada alrededor de las placas o si cambian dicho fenotipo con la progresión de la patología, ni si sufren un proceso de degeneración/disfunción con el avance de la enfermedad como consecuencia de una activación crónica prolongada. En relación a esto, nuestro grupo ha descrito que en el hipocampo de pacientes con EA la microglía sufre un significativo proceso degenerativo (Sanchez-Mejias et al. 2016; Navarro et al., 2018; Gutierrez and Vitorica, 2018) con una marcada disminución de la población de células microgliales (sobre todo en el giro dentado) quedando las placas amiloides sin el recubrimiento de estas células. Esta pérdida microglial, mediada por las formas solubles de fosfo-tau, no ocurre en los modelos amiloidogénicos, aunque es posible que pudiera tener lugar una deficiente respuesta microglial con el tiempo.

En base a los antecedentes expuestos, se propone como **hipótesis de trabajo** que *la progresión de la patología amiloide está asociada con un proceso disfuncional/degenerativo de la microglía activada que rodea las placas con el avance de la enfermedad. A medida que degenera la microglía se produce un aislamiento ineficiente de las placas y, en consecuencia, se liberan oligómeros solubles hacia el parénquima cerebral produciendo daño axonal/sináptico y muerte neuronal y, además, contribuyendo a la propagación de la patología amiloide.*

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es caracterizar, principalmente a nivel celular y subcelular, los cambios morfológicos de la microglía asociada a placa con el avance de la enfermedad y su relación con la progresión de la patología amiloide. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Caracterizar la evolución temporal de la patología amiloide extracelular en el hipocampo del modelo amiloidogénico APP/PS1.

1.1. Determinar cambios morfológicos y de toxicidad en las placas amiloides con la progresión de la enfermedad. Para ello, se estudiarán diversos parámetros, como la carga amiloide, el tamaño de las placas, el halo oligomérico y la patología neurítica asociada, en animales de 4, 6, 12 y 18 meses de edad. Se utilizarán técnicas histológicas e inmunohistoquímicas a microscopía óptica convencional, láser confocal y microscopía electrónica de transmisión, así como técnicas estereológicas y de análisis de imagen.

1.2. Analizar las alteraciones metabólicas que acompañan a la progresión de la patología amiloide y al proceso neurodegenerativo. Se analizará el perfil metabólico del hipocampo de animales APP/PS1 a 6 y 12 meses de edad. Este estudio se realizará en colaboración con el servicio de Nanoimagen del Bionand (Málaga).

Objetivo 2. Estudiar la interacción entre la microglía activada y la patología amiloide durante la progresión de la enfermedad en el hipocampo del modelo amiloidogénico APP/PS1.

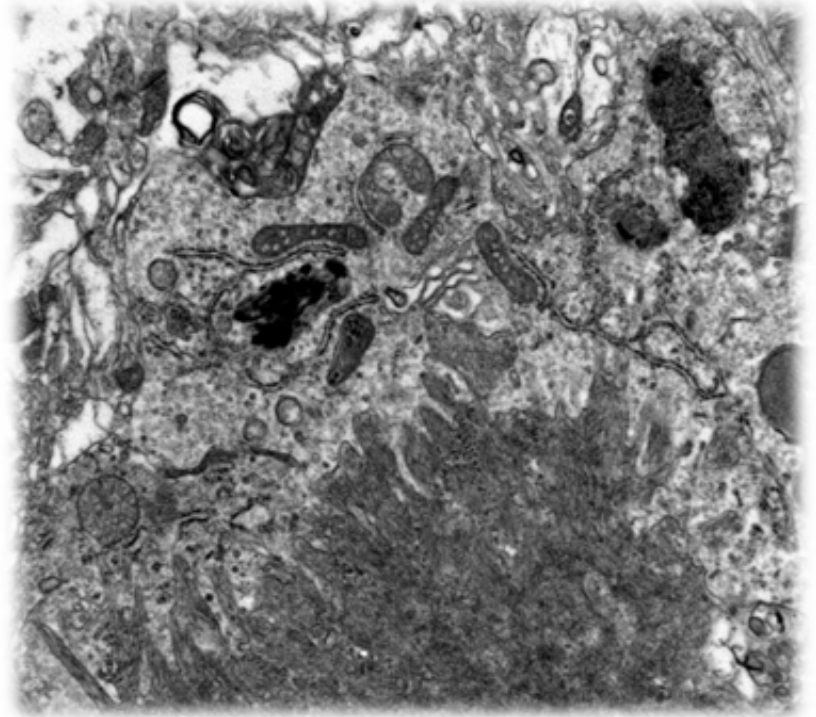
2.1. Determinar si hay cambios dependientes de la progresión de la enfermedad en el perfil transcriptómico de la microglía aislada de animales en fases iniciales y avanzadas de la patología.

2.2. Estudiar a nivel celular y subcelular los fenotipos microgliales, la interacción entre la microglía activada y las placas amiloides, y los posibles cambios degenerativos de la microglía a medida que progresa la enfermedad en el modelo transgénico desde los 4 a los 18 meses de edad. Se realizarán estudios de inmunomarcaje a microscopía óptica convencional, láser confocal y electrónica, en combinación con análisis de imagen.

Objetivo 3. Determinar el efecto sobre la patología amiloide de la inoculación intracerebral de fracciones cerebrales solubles derivadas de animales APP/PS1 y de pacientes de Alzheimer: estudios *in vivo* en modelos de las formas genéticas y esporádicas de la enfermedad.

Las fracciones cerebrales solubles (S1) conteniendo formas solubles de A β derivadas de modelos amiloidogénicos APP/PS1 y de muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) serán inoculadas mediante inyección estereotóxica en el hipocampo de ratones WT y diversos modelos amiloidogénicos, tanto de las formas familiares de la enfermedad (APP_{751SL} y 3xTgAD) como de la forma esporádica (hA β -KI). El efecto de las fracciones S1 se analizará mediante pruebas conductuales *in vivo*, inmunohistoquímica, técnicas estereológicas y análisis de imagen. Parte de este objetivo se ha llevado a cabo durante una estancia de investigación predoctoral en el laboratorio del Dr. Frank M. LaFerla en la Universidad de California en Irvine (Estados Unidos).

2. Material y Métodos



2.1. SUJETOS DE ESTUDIO

2.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En este trabajo se emplearon ratones de las siguientes líneas transgénicas como modelo de la enfermedad de Alzheimer:

- Ratones transgénicos APP_{751SL} (APP) con fondo genético C57BL/6, que presentan en heterocigosis el gen humano de la proteína precursora amiloide (*hAPP*) con las mutaciones de Alzheimer familiar sueca (KM670/671NL) y londinense [V717I] (**figura 2.1**), bajo el control del promotor Thy1.
- Ratones doble transgénicos APP_{751SL}/PS1_{M146L} (APP/PS1) con fondo genético C57BL/6, que se obtienen al cruzar ratones heterocigotos APP_{751SL} con homocigotos PS1_{M146L}, que sobreexpresan el gen humano mutado (M146L) de la Presenilina-1 bajo el control del promotor HMG-CoA reductasa.
- Ratones triple transgénicos PS1_{M146L}/APP_{Swe}/Tau_{P301L} (3xTgAD), obtenidos a partir de animales *knock-in* PS1_{M146L} con fondo genético C57BL/6, a los cuales se realizó la microinyección de los genes *hAPP* con la mutación sueca (KM670/671NL) y *hTau* con la mutación P301L (isoforma 4R/2N), ambos bajo el control del promotor Thy-1.
- Ratones transgénicos hAβ-KI con fondo genético C57BL/6, que presentan la secuencia del Aβ humano no mutado dentro del gen *APP* endógeno de ratón.

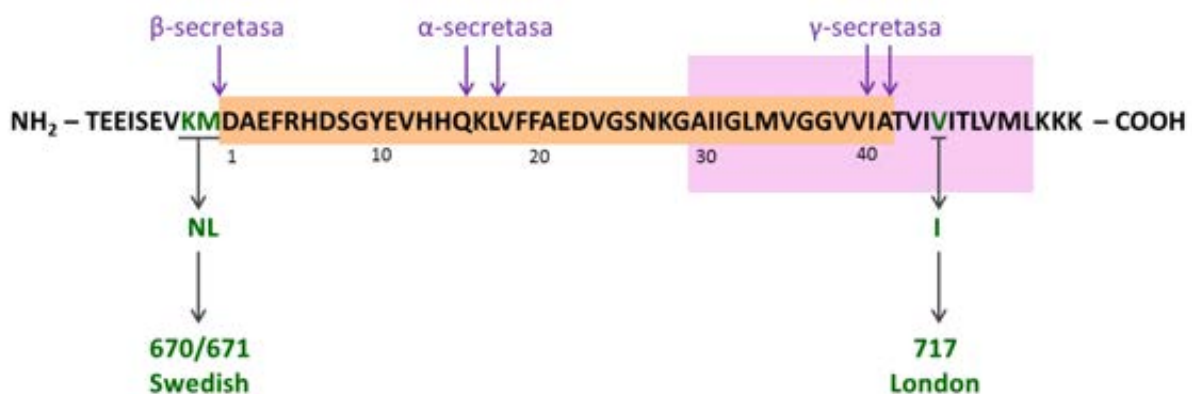


Figura 2.1. Esquema de las mutaciones sueca y londinense en la proteína precursora amiloide humana (hAPP) del modelo transgénico APP_{751SL}. La figura muestra parte de la secuencia aminoacídica de la proteína APP, indicándose en color verde los aminoácidos afectados por las mutaciones sueca (aminoácidos 670 y 671, KM → NL) y londinense (aminoácido 717, V → I). En color naranja se muestra la parte de la secuencia que da lugar a la proteína β-amiloide, y en rosa la región de APP que conforma la fracción transmembrana. Las flechas moradas indican los sitios de corte de las enzimas que procesan APP (α-secretasa, β-secretasa y γ-secretasa).

Como controles se emplearon ratones no transgénicos o silvestres (*wildtype*, WT) que presentaban el mismo fondo genético y de la misma edad. En cada experimento realizado en este trabajo, el tejido de distintos genotipos y edades fue procesado de forma paralela.

Los animales parentales PS1_{M146L} y APP_{751SL} para generar las distintas colonias y los dobles transgénicos APP_{751SL}/PS1_{M146L} fueron suministrados por la industria farmacéutica Sanofi (París, Francia) a través de Charles-River Laboratories (Francia). La generación y caracterización inicial del modelo APP_{751SL}/PS1_{M146L} ha sido previamente descrita (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008; Caballero et al. 2007; Jimenez et al. 2011; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014). Estos animales se mantuvieron en el Centro de Experimentación Animal de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga bajo unas condiciones controladas de temperatura media (21±1°C) y fotoperiodo (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad). Dichos animales tuvieron libre acceso a agua y una dieta *ad libitum* estándar.

Los experimentos que se llevaron a cabo en la Universidad de Málaga se han realizado de acuerdo con las directrices del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) siguiendo la normativa española (Real Decreto 53/2013) para la protección de animales utilizados en experimentación. Además, los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Uso de Animales para la Investigación de la Universidad de Málaga. El número de animales empleados, así como el estrés y sufrimiento de éstos durante la manipulación y experimentación se ha reducido al máximo, de acuerdo con la regla de las 3R (reemplazar, reducir y refinar).

Los modelos animales hA β -KI y 3xTgAD fueron generados en el laboratorio del Dr. Frank M. LaFerla, en el cual se realizó parte del objetivo 3 de la presente Tesis durante una estancia predoctoral en la Universidad de California, Irvine (EEUU). Estos animales se mantuvieron en el estabulario del *Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders* (UCI MIND) bajo unas condiciones controladas de temperatura (21±1°C) y luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas del *National Institute of Health* (NIH).

El número de animales empleados para cada uno de los experimentos de este trabajo queda reflejado en las **tablas 2.1-2.3**.

Tabla 2.1. Relación de animales APP/PS1 y WT empleados en los estudios inmunohistoquímicos para microscopía óptica y electrónica (Objetivos 1.1 y 2) y metabólica (Objetivo 1.2). Animales empleados en la caracterización de las placas amiloides, el análisis metabólico de corteza e hipocampo y el estudio de la relación entre las placas y la microglía. Se empleó un total de 82 animales.

Genotipo	4 meses	6 meses	12 meses	18 meses	Experimentos
APP/PS1	7	8	8	7	Análisis fenotípico de las placas (Objetivo 1.1)
APP/PS1	-	6	6	-	Análisis metabólico (Objetivo 1.2)
WT	-	6	6	-	
APP/PS1	6	8	8	6	Relación microglía-placa (Objetivo 2)
Total	13	28	28	13	82

Tabla 2.2. Relación de animales APP y WT inyectados en los experimentos *in vivo* realizados en la Universidad de Málaga (objetivo 3.1). Los animales fueron operados cuando tenían 4 meses de edad. Se empleó un total de 111 animales (n = 11-16 animales/grupo).

Inyección	APP	WT
Fracción soluble Braak V-VI	16	14
Fracción soluble APP/PS1	15	15
PBS	15	14
No inyectados	11	11
Total	111	

Tabla 2.3. Relación de animales hA β -KI y 3xTgAD inyectados en los experimentos *in vivo* realizados en la Universidad de California, Irvine (objetivo 3.2). Los animales se operaron cuando tenían una edad de 7-8 meses. Se empleó un total de 53 animales (n = 5-9 animales/grupo).

Inyección	3xTgAD		hA β -KI	
	Seeding 5 m	Seeding 10 m	Seeding 5 m	Seeding 10 m
Fracción soluble Braak VI	6	8	7	6
PBS	6	9	5	6
Total	53			

2.1.2. MUESTRAS HUMANAS POST MORTEM

Las muestras *post mortem* de cerebro humano (región hipocampal) fueron cedidas por los Biobancos de Barcelona (Instituto de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica, IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge) y de Madrid (Banco de Tejidos BT-CIEN, Fundación CIEN, Instituto de Salud Carlos III), de acuerdo con las normas generales de la legislación española y del comité ético local. El tejido humano *post mortem* (corteza frontal) empleado en los experimentos realizados en la Universidad de California en Irvine fue cedido por el *Alzheimer's Disease Research Center at UCI* (ADRC-UCI), y se trató de acuerdo con la legislación del *National Institute of Health* (NIH). La relación de muestras humanas empleadas se detalla en la **tabla 2.4**. Una vez realizada la autopsia a los pacientes, las muestras fueron procesadas, examinadas y clasificadas en función de la patología de tau de acuerdo a los estadios de Braak (Braak and Braak 1991). Para los experimentos se empleó tejido de individuos en estadios Braak II (no dementes) y Braak V-VI (con demencia) (Braak and Braak 1991).

Tabla 2.4. Relación de las muestras humanas analizadas en el presente estudio. Sujetos control, Braak II, y sujetos con neuropatología asociada a la enfermedad de Alzheimer, Braak V-VI, así como los datos asociados a la edad, sexo, tiempo *post mortem*, clasificación Braak y CERAD y causa de la muerte.

Caso	Edad	Sexo	Tiempo <i>post mortem</i>	Braak ^a	CERAD ^b	Causa de la muerte
1	86	Mujer	5 h 35 min	II	A	Insuficiencia respiratoria. Derrame pleural
2	79	Hombre	4 h 15 min	II	0	Insuficiencia respiratoria y cardíaca
3	86	Mujer	4 h 15 min	II	A	Infarto agudo de miocardio anterior extenso
4	77	Mujer	-	V-VI	C	-
5	63	Mujer	13 h 30 min	V-VI	B	Neoplasia pulmonar

Caso	Edad	Sexo	Tiempo <i>post mortem</i>	Braak ^a	CERAD ^b	Causa de la muerte
6	93	Hombre	5 h	V-VI	C	-
7	87	Mujer	5 h 15 min	V-VI	C	-

^aClasificación en los estadios de Braak I-VI, según la distribución topográfica de ovillos neurofibrilares.

^bClasificación CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease), basada en la frecuencia de placas neuríticas: 0, ninguna; A, escasa; B, moderada; C, frecuente. Un guión indica información ausente.

2.2. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

2.2.1. FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL TEJIDO DE RATÓN

Antes de la fijación por perfusión vascular, los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico mediante inyección intraperitoneal (dosis de 60 mg/kg). La perfusión vascular transcardiaca se realizó empleando una bomba de perfusión (Dinko, D25V). Primero, se lavó con tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 (**ver apéndice 2.13.1**) durante un minuto aproximadamente hasta eliminar la sangre del sistema circulatorio. A continuación, se perfundió con la solución fijadora compuesta por paraformaldehído 4%, L-lisina 75 mM y metaperyodato sódico 10 mM en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4 (solución PLP; **ver apéndice 2.13.3**). Para perfundir a cada animal se emplearon aproximadamente 200 ml de solución fijadora a un flujo continuo de 10 ml/minuto. Una vez realizada la fijación por perfusión vascular, se extrajeron los cerebros y éstos fueron postfijados por inmersión en PLP durante una noche a 4°C. Seguidamente, los cerebros se lavaron en tampón PBS, realizando 3 lavados de 10 minutos para eliminar los restos de solución fijadora. Los cerebros que iban destinados a microscopía electrónica siguieron un procesamiento diferente a partir de aquí (**ver apartado 2.6**). Los cerebros destinados a microscopía óptica se crioprotegieron empleando una solución de sacarosa al 30% (**ver apéndice 2.13.4**) hasta que se hundieron por completo en dicha solución. Finalmente, los cerebros se congelaron con nieve carbónica durante un minuto y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

2.2.2. OBTENCIÓN DE CORTES DE CEREBRO DE RATÓN

Con el objetivo de realizar técnicas inmunohistoquímicas y tinciones histológicas para microscopía óptica, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 µm de grosor empleando un microtomo de congelación (Leica, CM-1325). Las secciones de cada cerebro se almacenaron de forma seriada en una placa multipocillo con PBS 0,1 M y azida sódica 0,02% (**ver apéndice 2.13.1**) para evitar el crecimiento de hongos. Las secciones de la región telencefálica, donde se localiza el hipocampo, se recogieron secuencialmente en series de forma rostro-caudal (7 series por cerebro). En cada serie había una representación rostro-caudal de 1/7 parte del telencéfalo, con una distancia de 280 µm entre secciones. Las placas multipocillo con las series de cerebro ya cortado se almacenaron a 4°C, renovando el PBS con azida sódica cada cierto tiempo para evitar la evaporación del tampón.

2.2.3. DELIMITACIÓN ANATÓMICA DE LAS REGIONES CEREBRALES DE RATÓN

La principal región de estudio de este trabajo es la formación hipocampal, ya que es una de las áreas más afectadas en la enfermedad de Alzheimer. Por ello, se seleccionaron secciones coronales que contuvieran hipocampo, para posteriormente realizar tinciones histológicas e inmunohistoquímicas y analizar la patología en dicha región.

La formación hipocampal ocupa una parte de la corteza cerebral con forma de cuerno a lo largo del ventrículo lateral y se sitúa en el lóbulo temporal medial. La formación hipocampal está compuesta por el subículo, el hipocampo propio (*cornu ammonis o asta de Ammon*, CA) y el giro dentado. La delimitación anatómica del hipocampo se realizó empleando el atlas de Franklin y Paxinos para cerebro de ratón (ver figura 2.2) (Franklin and Paxinos

2008). El hipocampo está presente desde el nivel 39 (Bregma -0,94 mm) hasta el nivel 64 (Bregma -4,04 mm). En su extremo más rostral, el hipocampo limita dorsalmente con el cuerpo caloso, ventralmente con el tálamo dorsal y lateralmente con los ventrículos laterales. En secciones más caudales, el hipocampo se alarga ventralmente hacia la amígdala y limita lateralmente con las cortezas entorrinal, perirrinal, ectorrinal y temporal asociativa, auditiva y visual.

La región CA1 aparece en el cerebro de ratón a partir del nivel 41 (Bregma -1,22 mm) y se extiende hasta el nivel 63 (Bregma -3,88 mm). Esta región limita dorsalmente con el cuerpo caloso, ventralmente con el giro dentado y lateralmente con CA2. En cortes más caudales, CA1 se alarga ventralmente llegando hasta la zona de la amígdala, y en la parte dorsal aparece el subículo, que constituye el límite dorsomedial de CA1.

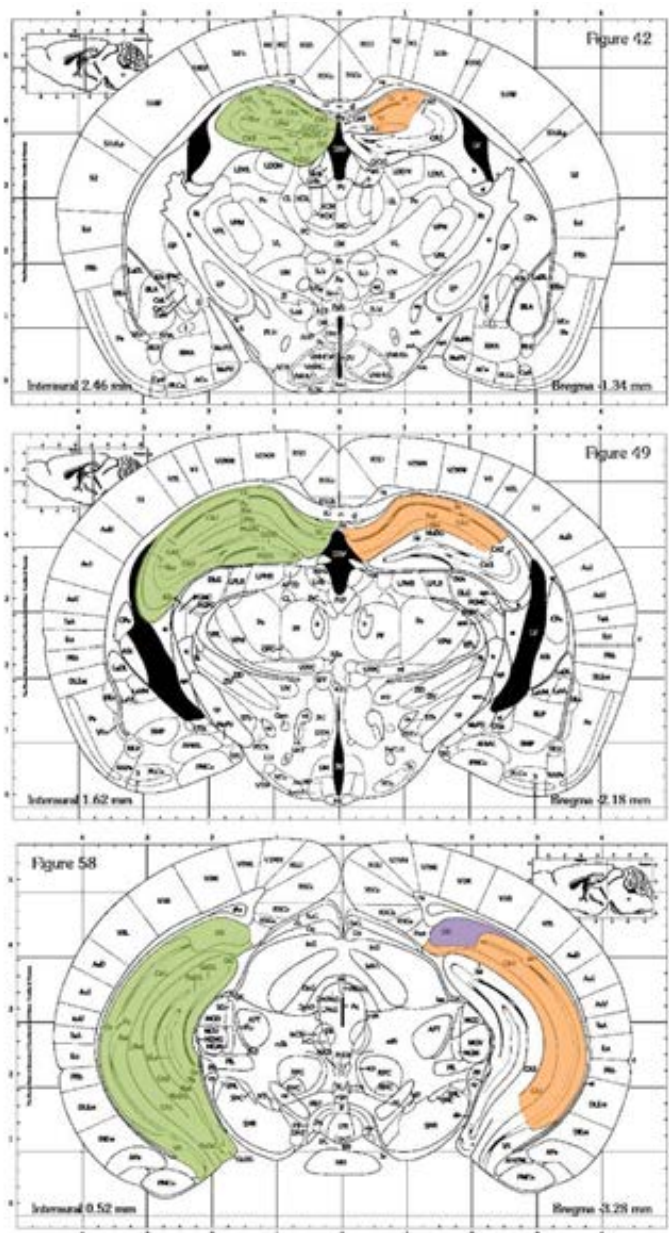


Figura 2.2. Delimitación anatómica de la formación hipocampal en el cerebro de ratón. En verde se indica la localización de la formación hipocampal en varios niveles rostrocaudales. En naranja se muestra la localización de la región CA1 y en morado la del subículo. Esquemas tomados del atlas de Franklin and Paxinos (2008).

El subículo se extiende desde el nivel 51 (Bregma -2,46 mm) hasta el nivel 62 (Bregma -3,80 mm). El subículo limita lateralmente con CA1 y el giro dentado, ambas regiones pertenecientes al hipocampo. Dorsalmente al subículo, se encuentra el cuerpo calloso y el límite dorsomedial es la corteza retrosplenial granular. En cortes más caudales, el límite dorsal del subículo está constituido por el cuerpo calloso, mientras que el límite medial lo constituye el postsubículo y el límite ventral lo forman CA1 y el giro dentado.

2.2.4. PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CORTES DE TEJIDO HUMANO

En la autopsia del paciente, se realizó la extracción del cerebro y el personal del Biobanco correspondiente diseccionó las distintas regiones cerebrales. Uno de los hemisferios cerebrales se sometió a postfijación por inmersión durante dos horas en paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M pH 7,4. Posteriormente, el cerebro se cortó en pequeños bloques que se postfijaron a 4°C durante 24-48 horas. Finalmente, las muestras se crioprotegieron en soluciones de sacarosa de concentración creciente y se almacenaron a -80°C. Las muestras de tejido humano fueron enviadas a nuestro laboratorio, donde se cortaron en secciones coronales de 30 µm de grosor en el microtomo de congelación. Las secciones obtenidas se almacenaron de forma seriada (6 series/placa) en placas multipocillo con PBS 0,1 M y azida sódica 0.02% y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

La delimitación anatómica del hipocampo y la corteza frontal en tejido humano se hizo en relación a las estructuras corticales adyacentes a estas regiones, empleando un atlas de cerebro humano (ver figura 2.3) (Jürgen et al. 2008).

La formación hipocampal está formada por el hipocampo propio (CA1, CA2, CA3 y GD) y el subículo (S), y se localiza coronalmente entre las coordenadas estereotáxicas Bregma 6,7 mm y 44,9 mm. Debido a la limitación de grosor de las muestras recibidas, así como las diferencias en el nivel a lo largo del eje rostro-caudal, solo fueron examinadas las áreas comprendidas entre las coordenadas 17 mm y 35 mm.

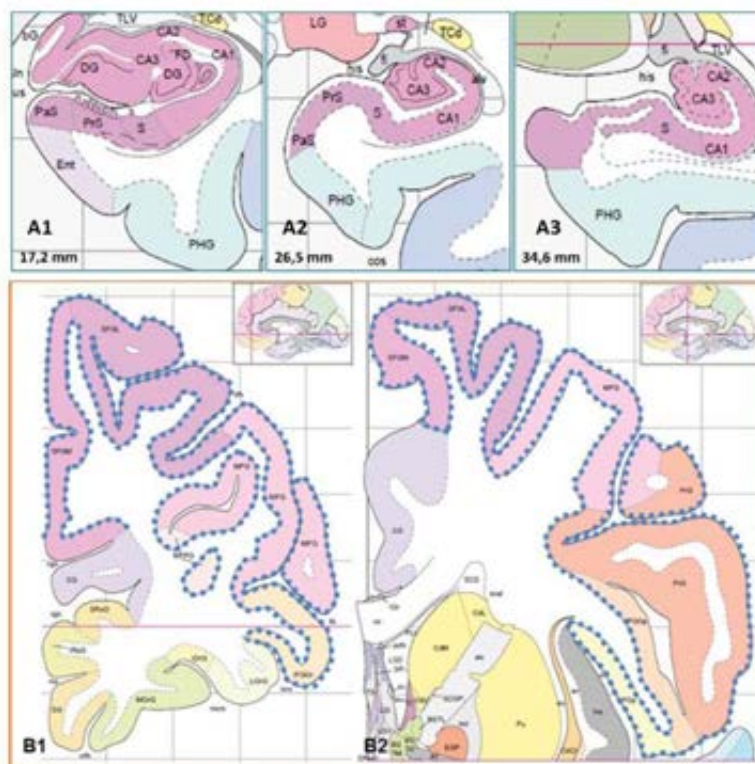


Figura 2.3. Delimitación anatómica del hipocampo y la corteza frontal en muestras humanas. Las muestras de hipocampo recibidas (A1-3) comprendían los niveles coronales situados entre 17 mm y 35 mm. Para la corteza frontal (B1-2), se analizó el área comprendida entre las coordenadas -42 mm y -1,3 mm de Bregma.

En cuanto a la corteza frontal, ésta presenta una organización laminar formada por seis capas (capas I-VI). Esta región se sitúa coronalmente entre las coordenadas estereotáxicas Bregma -60 mm y 2,7 mm. Debido a la limitación de grosor del tejido empleado, solo se han examinado las áreas comprendidas entre las coordenadas -42 mm y -1,3 mm.

2.3. TINCIONES HISTOLÓGICAS

2.3.1. TIOFLAVINA-S

La Tioflavina-S (TioS) es una molécula con fluorescencia verde que se une específicamente a estructuras con conformación de hoja plegada β , por tanto, tiene alta afinidad por los agregados amiloides fibrilares y por los ovillos neurofibrilares. Esta tinción se empleó tanto por separado, como combinada con inmunofluorescencia para diversos marcadores. El protocolo de esta tinción se detalla a continuación:

- 3 lavados de 10 minutos cada uno en PBS 0,1 M.
- Incubación en Tioflavina-S al 0,02% diluida en etanol al 50% (**ver apéndice 2.13.10**). Todos los pasos a partir de entonces se realizaron en oscuridad, para evitar la pérdida de fluorescencia de la Tioflavina-S.
- 2 lavados de 5 minutos cada uno en etanol al 50%.
- 2 lavados de 5 minutos cada uno en PBS 0,1 M.
- Montar las secciones en portaobjetos previamente gelatinizados (**ver apéndice 2.13.5**) y dejar secar unos minutos.
- Montar el cubreobjetos con DABCO (**ver apéndice 2.13.8**) y conservar las muestras a 4°C y en oscuridad.

2.3.2. ROJO CONGO

El rojo Congo ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) es un colorante que se une específicamente a estructuras con conformación de hoja beta plegada. Por tanto, se une tanto a las fibras amiloides de las placas como a los ovillos neurofibrilares, siendo un marcador dependiente de conformación. Esta tinción puede observarse tanto a microscopía óptica de campo claro como a fluorescencia. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos cada uno) para eliminar los restos de azida sódica.
- Incubación en rojo Congo al 20% (**ver apéndice 2.13.10**) durante 3 minutos.
- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos) para eliminar el colorante excedente.
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
- Deshidratar y montar con DPX (**ver apéndice 2.13.7**).

2.3.3. DAPI

El DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico) es un fluorocromo azul que se une específicamente al ADN en regiones ricas en A-T. Este fluorocromo marca los núcleos

celulares y se ha empleado en combinación con inmunofluorescencia para diversos marcadores. El protocolo empleado fue el siguiente:

- Tras realizar la inmunofluorescencia, y antes de montar las secciones en portaobjetos, se incubó el tejido en una solución con DAPI a concentración 1:250 (ver apéndice 2.13.10) en agua destilada durante 10 segundos.
- 3 lavados de 10 minutos cada uno en PBS 0,1 M.
- Montar las secciones en portaobjetos previamente gelatinizados y dejar secar unos minutos.
- Montar el cubreobjetos con DABCO y conservar las muestras a 4°C y en oscuridad.

2.3.4. AZUL DE TOLUIDINA

El azul de toluidina ($(C_{15}H_{16}ClN_3S)_2ZnCl_2$) es un colorante básico que tiñe de color azul la heterocromatina y la sustancia de Nissl. Este colorante tiene metacromasia, con lo cual presenta un color azul (colorante ortocromático), pero cuando se expone a estructuras ricas en grupos aniónicos vira hacia un color violeta-rojo (colorante metacromático). Este colorante se une a los ácidos nucleicos y proteínas, tiñendo todo el tejido de azul con los núcleos de las células teñidos de un azul más intenso.

El azul de toluidina se ha empleado para teñir los cortes semifinos (1 μm de grosor aproximadamente) durante el proceso de corte en el ultramicrotomo (ver apartado 2.6.4), para identificar detalles estructurales y la región donde se realizarán los cortes ultrafinos para los estudios a microscopía electrónica de transmisión (MET). El protocolo de tinción con azul de toluidina fue el siguiente:

- Montar los cortes semifinos en portaobjetos gelatinizados y dejar secar en estufa a 80-100°C.
- Añadir unas gotas de azul de toluidina (ver apéndice 2.13.10) y dejar durante 1 minuto a 80-100°C.
- Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante.
- Dejar secar las secciones.
- Montar con cubreobjetos y DPX.

2.4. INMUNOTINCIONES PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la detección de moléculas específicas en el tejido de estudio, aprovechando la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. En este trabajo, cada experimento de inmunomarcado se realizó procesando en paralelo las secciones de cerebro de ratones de distintas edades y genotipos y/o grupos experimentales, con el fin de reducir la variabilidad del experimento y hacer estudios comparativos.

En algunos casos, los anticuerpos primarios requieren un pretratamiento para exponer los epítomos del antígeno a detectar en el tejido y, de este modo, aumentar la intensidad de la

señal inmunohistoquímica. Los pretratamientos requeridos por algunos de los anticuerpos primarios empleados en este trabajo se detallan a continuación:

- **Pretratamiento con ácido fórmico** (anticuerpos para A β). Tras haber lavado el tejido tres veces con PBS 0,1 M (10 minutos cada lavado) para eliminar los restos de azida sódica, se incubaron las secciones en ácido fórmico al 85% durante 3 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS 0,1M para eliminar los restos de ácido fórmico. Tras el pretratamiento, se siguió con el protocolo estándar de la inmunohistoquímica, que se detalla a continuación.
- **Pretratamiento con calor** (anticuerpos para APP, ASC, CD45, EAAT2, LAMP1, TREM2, anticuerpos para fosfo-Tau). Tras realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 0,1 M, el tejido se incubó en tampón citrato sódico pH 6 (ver apéndice 2.13.1) a 80°C durante 30 minutos. Tras esto, se dejó enfriar las secciones durante 10 minutos y se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS 0,1 M. A continuación, se siguió el protocolo general de la inmunohistoquímica.
- **Permeabilización con detergente** (anticuerpos para CD68 y LAMP1). Las secciones se incubaron durante una noche a 4°C en tampón PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2% (ver apéndice 2.13.1) para aumentar la penetración del anticuerpo primario a través de las membranas celulares. Tras esto, se siguió el protocolo general de la inmunohistoquímica.

Cuando se empleó la peroxidasa como método de revelado de la reacción inmunohistoquímica, antes de la incubación en anticuerpo primario y con el fin de evitar falsos positivos, se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena, así como al bloqueo de la avidina/biotina endógenas. El protocolo general, cuyos pasos se llevaron a cabo en agitación (agitador de rotación circular Nahita 685 y asimétrico tridimensional Heidolph Polymax 1040), es el siguiente:

- Lavar las secciones 3 veces (lavados de 10 minutos) en PBS 0,1 M para eliminar los restos de azida sódica.
- Inactivar la peroxidasa endógena por exceso de sustrato. Para ello, se incubó durante 20 minutos en una solución con H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) al 3% y metanol al 10% en PBS 0,1 M.
- 3 lavados de 10 minutos en PBS 0,1 M.
- Bloqueo de la avidina, la biotina y las proteínas de unión a la biotina que se encuentran de forma endógena en el tejido. Para esto, se empleó un kit de bloqueo avidina/biotina. Se incubó durante 30 minutos en cada solución (12 μ l de solución en 1 ml de PBS 0,1 M), con un paso intermedio de lavado en PBS 0,1 M (10 minutos).
- Lavado durante 10 minutos en PBS 0,1 M.
- A continuación, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario correspondiente. En todos los experimentos, se emplearon controles negativos de cada animal que fueron procesados de forma paralela junto con el resto de las muestras. En los controles negativos, se omitió la incubación en anticuerpo primario (o anticuerpos primarios), y en su lugar, se incubó en el tampón de dilución.

Tras la incubación en anticuerpo primario, el resto de los pasos de la técnica varían en función del tipo de inmunomarcaje (simple o múltiple) y de si el revelado se realiza con el método de la peroxidasa (microscopía óptica convencional) o con fluorocromos (microscopía confocal o de epifluorescencia), y se detallan en los siguientes subapartados.

2.4.1. INMUNOHISTOQUÍMICA SIMPLE PARA MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

- Tras los pasos de inactivación de la peroxidasa, y el bloqueo de la avidina y biotina endógenas, las secciones de cerebro de ratón se incubaron en anticuerpo primario. En algunos casos, para evitar reacciones inespecíficas, se realizó un paso previo de bloqueo con BSA al 5% en PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2% durante 30 minutos.
- La incubación en anticuerpo primario se realizó a 22°C en agitación continua y empleando como tampón de dilución PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2% y azida sódica al 0,1% (ver apéndice 2.13.1). El tiempo de incubación y la concentración de los anticuerpos primarios fueron variables. Las características de los distintos marcadores empleados y las condiciones de incubación de los diferentes anticuerpos primarios se muestran en las tablas 2.5 y 2.6.
- 3 lavados de 10 minutos en PBS 0,1 M.
- Incubación durante 70 minutos (temperatura ambiente) en un anticuerpo secundario biotinilado, el cual va dirigido contra el anticuerpo primario. La dilución se realizó en el mismo tampón que se emplea para el anticuerpo primario. En la tabla 2.7 se muestra la relación de anticuerpos secundarios biotinilados empleados y sus diluciones de uso.
- 3 lavados de 10 minutos en PBS 0,1 M.
- Incubación durante 90 minutos en una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa diluida 1:2000. La dilución se realizó en PBS 0,1 M con Triton X-100 al 0,2%.
- 3 lavados de 10 minutos en PBS 0,1 M.
- Para visualizar la marca inmunohistoquímica, se procedió al revelado de las muestras (figura 2.4). Este revelado puede realizarse incubando el tejido en una solución de DAB con o sin níquel. La solución de revelado contiene 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorhídrico (DAB) al 0,02% en tampón Tris clorhídrico 50 mM, 0,03% de níquel sulfato amónico y 0,03% de peróxido de hidrógeno en PBS 0,1 M (ver apéndice 2.13.6). La reacción da lugar a un precipitado marrón, en el caso del DAB, o azul oscuro, en el caso del DAB-níquel.
- Montaje de las secciones en portaobjetos gelatinizados. Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se mantuvieron en la estufa a 37°C durante una noche.
- Deshidratación y montaje empleando DPX.

Figura 2.4. Esquema de la inmunohistoquímica simple para campo claro. Mediante esta técnica, el antígeno es reconocido de forma específica por el anticuerpo primario, el cual a su vez se une al anticuerpo secundario biotinilado. Luego se añade el complejo extravidina-peroxidasa y los sustratos de la reacción enzimática (H_2O_2 y DAB reducido). La reacción da lugar al DAB oxidado que forma un precipitado marrón.

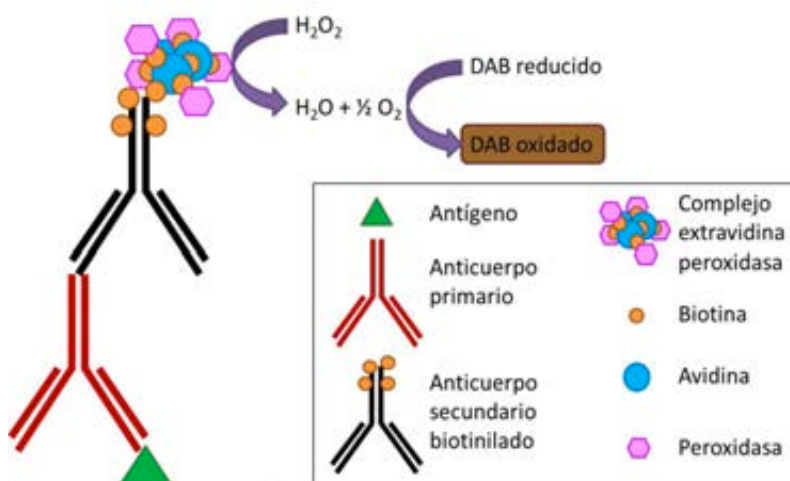


Tabla 2.5. Listado de marcadores estudiados mediante inmunohistoquímica y sus características.

Marcador	Características
Aβ	Péptido de entre 39 y 43 aminoácidos que se forma por el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) a través de la vía amiloidogénica. Anticuerpo 6E10: reconoce los aminoácidos 1-17 del péptido A β , con lo que también reconoce las formas precursoras. Anticuerpo BAM10: reconoce los aminoácidos 1-12 del A β , reconociendo también las formas precursoras. Anticuerpo 4G8: reconoce los aminoácidos 17-24 del péptido A β . Es un marcador de A β total, aunque puede reconocer formas precursoras.
Aβ_{42}	Péptido A β de 42 aminoácidos de longitud. Es la forma con mayor capacidad de agregación y toxicidad. Principal constituyente de las placas amiloides.
Aβ_{40}	Péptido A β de 40 aminoácidos de longitud. Esta forma tiene menor toxicidad que A β_{42} .
Aβ oligomérico	Formas oligoméricas de hasta 24 monómeros, las cuales presentan una elevada capacidad tóxica. Anticuerpo OC: reconoce oligómeros prefibrilares. Es un anticuerpo dependiente de conformación.
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> . Expresada por la microglía y los macrófagos, participa en la inflamación y apoptosis.
APP	Proteína precursora amiloide. Su procesamiento proteolítico da lugar al péptido A β . Se acumula en las neuritas distróficas. El anticuerpo APP reconoce el extremo C-terminal (aminoácidos 676 a 695).
CD45	Receptor de membrana expresado en macrófagos, linfocitos y microglía. Está implicado en la activación de linfocitos T. Es un marcador específico de macrófagos infiltrados y microglía reactiva.
CD68	Proteína de membrana presente en los lisosomas/endosomas. Pertenece a la familia LAMP. Es un marcador de microglía, macrófagos y monocitos.
EAAT2	<i>Excitatory amino-acid transporter 2</i> . Molécula transportadora de glutamato, necesaria para eliminar el exceso de glutamato de la hendidura sináptica. Es un marcador específico de astrocitos.
Ferritina	Proteína implicada en el almacenamiento de hierro intracelular, presente en todos los tipos celulares. La microglía senescente/degenerativa expresa una elevada cantidad de ferritina.

Marcador	Características
Galectina 3	Es una lectina que se une a receptores glicosilados presentes en células inmunes. Se sobreexpresa en la microglía en la EA y promueve la fagocitosis. Aunque principalmente se expresa en la microglía, también lo hace en algunos astrocitos y neuronas.
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial. Constituyente de los filamentos intermedios de los astrocitos. Es un marcador específico de la astrogía.
Iba1	<i>Ionized calcium binding adapter molecule</i> . Proteína del citoesqueleto de membrana, implicada en los cambios morfológicos de la microglía y los macrófagos.
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> . Proteína de membrana presente en los lisosomas/endosomas tardíos. También denominada CD107a. Su expresión aumenta en las neuronas y células gliales alrededor de las placas amiloides.
Olig2	Factor de transcripción 2 de oligodendrocitos. Marcador específico de oligodendroglía.
Tau forforilada	Proteína asociada a microtúbulos que se encarga de su estabilización. En la EA se hiperfosforila, alterándose el citoesqueleto neuronal y dando lugar a los NFTs. Anticuerpo AT8: reconoce Tau fosforilado en los residuos Ser199, Ser202 y Thr205. Anticuerpo AT100: reconoce Tau fosforilado en los residuos Ser199, Ser202, Thr205, Thr212 y Ser214. Anticuerpo AT180: reconoce Tau fosforilado en el residuo Thr231 PHF1: reconoce Tau fosforilado en los residuos Ser396 and Ser404.
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i> . Receptor que se expresa en células de origen mieloide, siendo un marcador específico de la microglía activada con perfil de activación DAM.

Tabla 2.6. Listado de anticuerpo primarios empleados para estudios inmunohistoquímicos.

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Tiempo y temperatura de incubación	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
Anti-Aβ 1-17 (6E10)	1:5000	24h, 22°C	Ratón	Covance, ref. SIG-39320
Anti-Aβ 1-12 (BAM10)	1:2000	24h, 22°C	Ratón	Sigma, ref. A5213
Anti-Aβ 17-24 (4G8)	1:2000	24h, 22°C	Ratón	Covance, ref. SIG-39240
Anti-Aβ₄₂	1:5000	24h, 22°C	Conejo	Abcam, ref. 39377
Anti-Aβ₄₀	1:1000	24h, 22°C	Conejo	Millipore, ref. AB5074P
Anti-Aβ oligomérico prefibrilar (OC)	1:5000	24h, 22°C	Conejo	Millipore, ref. AB2286
Anti-ASC	1:1000	48h, 22°C	Conejo	Adipogen, ref. AL177
Anti-APP-C term	1:100000	24h, 22°C	Cabra	Meridian Life Sciences, ref. Q2B100G
Anti-CD68	1:1000	24h, 22°C	Conejo	Abcam, ref. ab125212
Anti-CD45	1:500	24h, 22°C	Rata	AbD Serotec, ref. MCA1388
Anti-EAAT2	1:10000	24h, 22°C	Conejo	Abcam, ref. ab41621
Anti-Ferritina	1:10000	72h, 22°C	Conejo	Sigma, ref. F6136
Anti-Galectina3	1:5000	24h, 22°C	Cabra	R&D, ref. AF1197
Anti-GFAP	1:2000	24h, 22°C	Pollo	Chemicon, ref. AB5541

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Tiempo y temperatura de incubación	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
Anti-GFAP	1:10000	24h, 22°C	Conejo	Dako, ref. z0334
Anti-Iba1	1:2000	24h, 22°C	Cabra	Abcam, ref. ab5076
Anti-Iba1	1:1000	24h, 22°C	Conejo	Wako, ref. 019-19741
Anti-LAMP1	1:500	24h, 22°C	Rata	Sigma, ref. MABC39
Anti-Olig2	1:5000	24h, 22°C	Ratón	DHSB, ref. PCR-OLIG2-1E9-s
Anti-PHF-Tau (AT8)	1:1000	24h, 22°C	Ratón	ThermoFisher, ref. MN1020B
Anti-PHF-Tau (AT100)	1:1000	24h, 22°C	Ratón	ThermoFisher, ref. MN1060
Anti-PHF-Tau (AT180)	1:1000	24h, 22°C	Ratón	ThermoFisher, ref. MN1040
Anti-PHF-Tau (PHF1)	1:1000	24h, 22°C	Ratón	Cedido por el Dr. Peter Davies
Anti-TREM2	1:1000	48h, 22°C	Oveja	R&D, ref. BAF1729

Tabla 2.7. Anticuerpos secundarios biotinilados empleados en inmunohistoquímica para microscopía a campo claro.

Anticuerpo secundario	Dilución de uso	Tiempo y temperatura de incubación	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
Anti-IgG de cabra	1:500	70 min, 22°C	caballo	Vector Labs, ref. BA-9500
Anti-IgG de conejo	1:500	70 min, 22°C	cabra	Vector Labs, ref. BA-1000
Anti-IgG de conejo	1:250	70 min, 22°C	burro	GE Life Sciences, ref. RPN1004
Anti-IgG de oveja	1:500	70 min, 22°C	conejo	Vector Labs, ref. BA-6000
Anti-IgG de pollo	1:500	70 min, 22°C	cabra	Vector Labs, ref. BA-9010
Anti-IgG de rata	1:500	70 min, 22°C	cabra	Vector Labs, ref. BA-9400
Anti-IgG de ratón	1:500	70 min, 22°C	cabra	Vector Labs, ref. BA-9200
Anti-IgG de ratón	1:500	70 min, 22°C	burro	ThermoFisher, ref. PA1-28627

2.4.2. INMUNOHISTOQUÍMICA DOBLE PARA MICROSCOPÍA DE CAMPO CLARO (DAB-NI/DAB)

Para el marcaje inmunohistoquímico doble con dos anticuerpos primarios diferentes se empleó también el método de la peroxidasa, siendo necesario utilizar un método de revelado que permitía obtener productos de reacción de diferente color para cada anticuerpo. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- Para el primer antígeno a detectar, se siguió el protocolo inmunohistoquímico descrito en el apartado anterior. Se realizó el revelado empleando DAB y níquel (marcaje de color azul oscuro).
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos cada uno).
- Incubación con el segundo anticuerpo primario y, a continuación, con el correspondiente anticuerpo secundario.
- Incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa.
- Para el revelado del segundo antígeno, se emplea solo DAB (sin níquel) en la solución de revelado (marcaje de color marrón).
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos).
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejar secar durante una noche.
- Deshidratación y montaje con DPX.

2.4.3. INMUNOFLUORESCENCIA MÚLTIPLE PARA MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

La microscopia láser confocal permite realizar estudios de colocalización empleando moléculas fluorescentes con distintos espectros de absorción/emisión de fluorescencia. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias dobles y triples con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (**figura 2.5**), así como inmunofluorescencias simples combinadas con tinciones con moléculas fluorescentes (Tioflavina-S, DAPI). El protocolo general de la inmunofluorescencia fue similar al de la inmunohistoquímica a campo claro, con la diferencia de que no fue necesario bloquear la peroxidasa endógena, puesto que no se empleó la peroxidasa como método de revelado. Tampoco fue necesario bloquear la avidina y biotina endógenas, ya que los anticuerpos secundarios estaban directamente acoplados a un fluorocromo. El protocolo seguido para la inmunohistoquímica doble fue el siguiente:

- Se realizó el protocolo descrito anteriormente para la inmunohistoquímica hasta la incubación en el anticuerpo primario.
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos cada uno).
- Incubación con el segundo anticuerpo primario en sus correspondientes condiciones de temperatura, tiempo y concentración (en el caso de inmunofluorescencia doble).
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos).
- Incubación con el tercer anticuerpo primario en sus correspondientes condiciones de temperatura, tiempo y concentración (en el caso de inmunofluorescencia triple).
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos).
- Incubación en el primer anticuerpo secundario acoplado a fluorocromo a una dilución 1:1000 en PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2% durante 1 hora a 22°C (**ver tabla 2.8**).
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos).
- Incubación con el segundo anticuerpo secundario acoplado a fluorocromo (dilución 1:1000) en PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2% durante 1 hora a 22°C (en el caso de inmunofluorescencia doble) (**tabla 2.8**).
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos).
- Incubación con el tercer anticuerpo secundario acoplado a fluorocromo (dilución 1:1000) en PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2% durante 1 hora a 22°C (en el caso de inmunofluorescencia triple) (**tabla 2.8**).
- 3 lavados con PBS 0,1 M (10 minutos).
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados.
- Cuando se empleó tejido de animales viejos, los cuales presentan acumulación de gránulos de lipofucsina autofluorescentes, fue necesario eliminar la autofluorescencia. Para ello, se realizaron incubaciones en gota en una cámara húmeda. Primero se incubó en etanol de 70° durante 5 minutos y, a continuación, se incubó en el kit de eliminación de autofluorescencia otros 5 minutos. Por último, se realizaron lavados en etanol 70° para eliminar el exceso de producto.
- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos) y montaje con DABCO.

Figura 2.5. Esquema de la inmunofluorescencia triple.

Tras la incubación con anticuerpos primarios desarrollados en distintas especies, se incubó con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos diferentes. Se han empleado anticuerpos secundarios acoplados a los fluorocromos Alexa488, Alexa568 y Cy5.

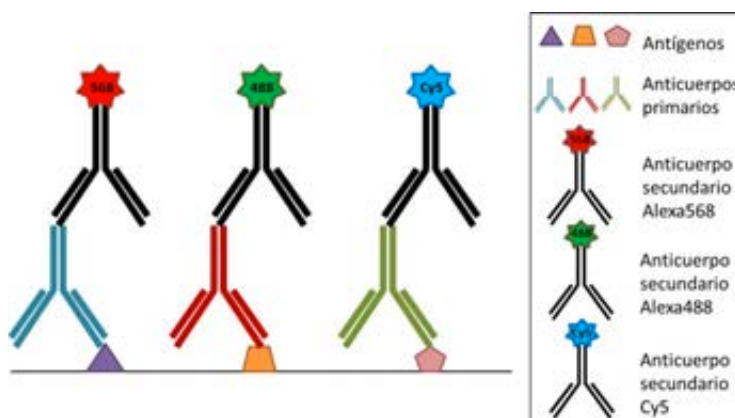


Tabla 2.8. Listado de anticuerpos secundarios fluorescentes empleados en inmunofluorescencia. Alexa Fluor® 488 presenta el máximo de absorción a una longitud de onda de 495nm y el máximo de emisión a 519nm (verde). Alexa Fluor® 568 presenta el máximo de absorción a una longitud de onda de 578nm y el máximo de emisión a 603nm (rojo). Cy5® presenta el máximo de absorción a una longitud de onda de 650nm y el máximo de emisión a 667nm (rojo lejano).

Anticuerpo secundario	Fluorocromo	Dilución de uso	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor® 488	1:1000	Burro	Invitrogen, ref. A11055
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 488	1:1000	Burro	Invitrogen, ref. A21206
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 488	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A11008
Anti-IgG de pollo	Alexa Fluor® 488	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A11039
Anti-IgG de rata	Alexa Fluor® 488	1:1000	Burro	Invitrogen, ref. A21208
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor® 488	1:1000	Burro	Invitrogen, ref. A21202
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor® 568	1:1000	Burro	Invitrogen, ref. A11057
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 568	1:1000	Burro	Invitrogen, ref. A10042
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 568	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A11011
Anti-IgG de rata	Alexa Fluor® 568	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A11077
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor® 568	1:1000	Burro	Invitrogen, ref. A10037
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor® 568	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A11004
Anti-IgG de conejo	Cy5®	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A10523
Anti-IgG de rata	Cy5®	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A10525
Anti-IgG de ratón	Cy5®	1:1000	Cabra	Invitrogen, ref. A10524

2.4.4. CONTROLES PARA LA INMUNOHISTOQUÍMICA/INMUNOFLUORESCENCIA

Con el fin de demostrar la especificidad de los anticuerpos utilizados en la técnica inmunohistoquímica, en cada uno de los experimentos se emplearon controles negativos, es decir, secciones que fueron procesadas de forma simultánea pero que no fueron incubadas en el anticuerpo/s primario/s correspondiente/s. En su lugar, estas secciones fueron incubadas en el diluyente sin anticuerpo primario (PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2% y azida sódica al 0,1%). En ningún caso los controles negativos presentaron señal inmunohistoquímica. Como controles positivos de la técnica se emplearon secciones de tejido donde se conoce hay expresión del antígeno de estudio.

2.5. OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA

2.5.1. IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

Los preparados de inmunohistoquímica para microscopía óptica a campo claro fueron escaneados empleando el microscopio virtual Olympus VS120 (Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga) acoplado a un sistema óptico (Olympus BX61VS), a dos cámaras (Olympus VC50, color; Olympus VS-XM10, monocromo) y a un ordenador con el software VS (Olympus). Este sistema permitió tener una base de datos con las preparaciones virtuales escaneadas a 40x, con acceso remoto a través del programa Olyvia 2.6 (Olympus), el cual se empleó para tomar imágenes de las muestras (en formato .jpg con un tamaño de 1903x965 píxeles).

Además, también se tomaron imágenes microscópicas a campo claro empleando un microscopio Nikon (modelo Eclipse 80i) acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon DS-5M de 5 mega-píxeles. Este sistema conectado a un ordenador con el software ACT-2U (Imaging Software, Nikon Corporation 2004) permitió la toma de imágenes en formato .jpg con un tamaño de 2560x1920 píxeles.

2.5.2. IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para la toma de imágenes de epifluorescencia se empleó el microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara (Olympus DP71) y a una fuente de fluorescencia (Olympus U-RFL-T). Mediante el programa Cell-A (Olympus) se tomaron imágenes en formato .jpg con un tamaño de 2040x1536 píxeles.

Mediante microscopía confocal se puede estudiar la colocación de dos o más marcadores, puesto que permite obtener secciones ópticas muy finas (0,8 μm) o planos focales a lo largo del grosor de la muestra (eje Z). Para ello, las imágenes de fluorescencia a microscopía confocal se tomaron empleando un microscopio láser confocal Leica SP8 (Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga), acoplado a un ordenador con el software TCS NT (Leica). Las imágenes se tomaron empleando el objetivo 60X, a una resolución de 1024x1024 píxeles y en formato .lif. Por último, para la obtención de varias secciones ópticas en un mismo eje Z (Z-stack), se tomaron imágenes a intervalos de 0,50 μm de todo el grosor de la muestra.

2.5.3. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes de microscopía óptica de campo claro y de epifluorescencia fueron procesadas mediante el programa Adobe Photoshop CS2, mediante el cual se ajustó el brillo y contraste de las imágenes, así como su tamaño.

Por otro lado, las imágenes de microscopía confocal se procesaron con el programa informático LAS AF Lite (Leica) y se guardaron en formato .tiff para su posterior análisis. Se obtuvieron tanto imágenes correspondientes a un solo plano focal, como proyecciones de intensidad máxima de cada Z-stack. Para el análisis específico de colocación intracelular se

obtuvieron, además, planos ortogonales en los ejes YZ y XZ de cada una de las imágenes. La reconstrucción en volumen de las secciones recogidas en el Z-stack se obtuvo empleando el complemento volume viewer del programa de análisis de imagen FIJI (<http://fiji.sc/Fiji>).

Finalmente, las imágenes fueron montadas en láminas empleando el software Microsoft Office PowerPoint 2010 (Microsoft).

2.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

2.6.1. FIJACIÓN, CONSERVACIÓN Y OBTENCIÓN DE CORTES

El tejido destinado a microscopía electrónica de transmisión (MET) fue fijado tal y como se indica en el **apartado 2.2.1**. Una vez que los cerebros fueron postfijados con PLP y lavados con tampón PBS 0,1 M, éstos se pusieron en PBS con 0,02% de azida sódica y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Para la obtención de secciones, estos cerebros fueron encastrados en bloques de agarosa al 3% (**ver apéndice 2.13.9**), los cuales fueron cortados en un vibratomo (Leica, VT1000S). Se realizaron secciones coronales que se recogieron en placas multipocillo con PBS 0,1 M y 0,02% de azida sódica y se almacenaron a 4°C para su uso posterior. Las secciones destinadas a microscopía electrónica convencional se realizaron con un grosor de 250 µm, mientras que las secciones para inmunomarcaje con oro coloidal para microscopía electrónica (inmuno-oro) tenían un grosor de 50 µm.

2.6.2. POSTFIJACIÓN, DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN EN RESINA

Para microscopía electrónica de transmisión es necesario realizar una postfijación de las muestras, así como deshidratarlas e incluirlas en resina para poder obtener cortes ultrafinos. Se seleccionaron cortes que contuviesen diferentes niveles hipocampales. En el caso de las secciones empleadas para la técnica inmuno-oro para MET, el protocolo de postfijación, deshidratación e inclusión en resina se llevó a cabo después de haber realizado el inmunomarcaje (**ver apartado 2.6.5**). El protocolo seguido se indica a continuación:

- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos cada uno).
- Postfijación con tetróxido de osmio 1% en PB 0,1 M en oscuridad a 4°C (**ver apéndice 2.13.9**). Para las secciones de 250 µm (MET convencional), el tiempo de incubación fue de 1 hora y 30 minutos. Para las secciones de 50 µm (inmuno-oro), la incubación duró 20 minutos.
- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos).
- Deshidratación en acetona y contraste en bloque. Las secciones se sumergieron en acetona de concentración creciente, comenzando con acetona al 30% y, a continuación, acetona al 50%. El tiempo de incubación en cada paso fue de 30 minutos para las secciones de 250 µm y de 15 minutos para las de 50 µm. En el siguiente paso, se le dio contraste al tejido empleando acetona al 70% con acetato de uranilo al 1% durante 1 hora (secciones 250 µm) o 30 minutos (secciones de 50 µm) (**ver apéndice**

2.13.9). A continuación, las secciones se incubaron en acetona al 80% y al 90% durante 30 minutos (secciones de 250 μm) o 15 minutos (secciones de 50 μm). Finalmente, se realizaron dos pasos en acetona al 100% (2x30 minutos para las secciones de 250 μm , 2x15 minutos para las secciones de 50 μm).

- Infiltración de las secciones en una mezcla de acetona al 100% con resina (1:1) durante 1 hora (ver **apéndice 2.13.9**).
- Infiltración de las secciones en resina pura durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Inclusión en plano. Se colocaron las piezas de tejido entre dos portaobjetos forrados con papel aluminio, se añadió una pequeña cantidad de resina pura y se presionaron los dos portaobjetos con cuidado para eliminar burbujas. Los portaobjetos se colocaron en una estufa a 60°C durante 48 horas para la polimerización de la resina.

2.6.3. MONTAJE Y TALLADO DE LAS SECCIONES INCLUIDAS EN RESINA

Tras la polimerización de la resina, se separaron los dos portaobjetos, obteniéndose una lámina fina de resina donde se encontraba el tejido incluido. Con unas tijeras, se cortó la zona de tejido de interés y ésta se pegó con pegamento de secado rápido sobre un bloque de resina polimerizada. Una vez que el pegamento se había secado, se montó todo en el soporte del ultramicrotomo para llevar a cabo el tallado, que se realizó con una cuchilla muy afilada. En el proceso de tallado, se retiraron poco a poco porciones tanto de resina como de tejido que no era de nuestro interés. Tras este proceso, se obtuvo una pirámide truncada en cuya cara superior se encontraba nuestra región de interés. El tamaño de esta superficie dependía del tipo de cortes que iban a realizarse, semifinos para microscopía óptica o ultrafinos para MET. En el caso de las secciones ultrafinas, el área tallada tenía un tamaño muy pequeño (aproximadamente 0,5 mm²).

2.6.4. ULTRAMICROTOMÍA

Una vez que los bloques de resina estaban montados y tallados, se realizaron cortes semifinos y ultrafinos empleando un ultramicrotomo (modelo Ultracut E, Reichert-Jung). Primero se realizaron cortes semifinos (1 μm de grosor), que fueron teñidos con azul de toluidina tal y como se indica en el **apartado 2.3.4**. Estas secciones se observaron en el microscopio óptico para determinar el área de interés y volver a tallar un área más pequeña antes de realizar cortes ultrafinos. Tras haber hecho el retallado, se realizaron cortes ultrafinos (50-90 nm de grosor), que se recogieron de la balsa de la cuchilla y se pusieron en rejillas de níquel de 150 agujeros.

2.6.5. INMUNO-ORO PARA MET

El protocolo general seguido para la técnica de inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión (**figura 2.6**) se detalla a continuación:

- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos cada uno).
- En caso de que el anticuerpo primario así lo requiriese (**ver apartado 2.4**), se realizó un pretratamiento con calor.

- Incubación con glicina 50 mM en PBS 0,1 M a temperatura ambiente durante 5 minutos. Esto permitió romper los grupos aldehídos del fijador y favorecer la penetración del anticuerpo en el tejido.
- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos).
- Permeabilización mediante congelación/descongelación, para aumentar la penetración del anticuerpo en el tejido. Este proceso permitió permeabilizar las membranas celulares sin alterar ultraestructuralmente la morfología de la célula. Primero se incubaron las secciones en solución crioprotectora (ver apéndice 2.13.9) al 100% a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, las secciones en dicha solución crioprotectora se incubaron a -80°C durante 20 minutos. Tras dejar que atemperasen, las secciones se incubaron en soluciones crioprotectoras de concentración decreciente (100%, 70%, 50%, 30%) diluidas en PBS 0,1 M (10 minutos en cada solución).
- 1 lavado en PBS 0,1 M (10 minutos).
- Incubación en solución de bloqueo 1 (ver apéndice 2.13.9) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Incubación en anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo 1. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para la inmunohistoquímica (tabla 2.6), con la diferencia de que se emplearon tiempos de incubación de 48 horas para todos los anticuerpos primarios en inmuno-oro.
- 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos).
- Incubación en solución de bloqueo 2 (ver apéndice 2.13.9) durante 30 minutos.
- Incubación en anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 1,4 nm (Nanogold) a una dilución 1:100 en solución de bloqueo 1 a temperatura ambiente durante una noche (tabla 2.9).
- 3 lavados en solución de bloqueo 2 (5 minutos cada uno).
- 3 lavados en PBS 0,1 M (5 minutos cada uno).
- Postfijación con glutaraldehído al 2% en PBS 0,1 M durante 10 minutos.
- 2 lavados con agua destilada (3 minutos cada uno).
- 3 lavados con citrato sódico 0,02 M pH 7 (5 minutos cada uno).
- Incubación en kit HQ Silver™ para intensificar la señal. Se empleó la misma cantidad de los tres componentes del kit (1:1:1). Primero, se mezcló la solución iniciadora y la moderadora, y, a continuación, la solución activadora. El revelado tuvo un tiempo variable en función de la temperatura, ya que a mayor temperatura el kit precipita antes. Este tiempo de revelado fue de entre 5 y 10 minutos, no superando nunca los 11 minutos.
- 2 lavados con agua destilada (3 minutos cada uno).
- 1 lavado en PB 0,1 M (10 minutos).
- Virado al oro (*gold toning*). Mediante este proceso, las partículas de oro sustituyen a las partículas de plata con el fin de mantener la amplificación de la señal y evitar que el tratamiento con tetróxido de osmio posterior la elimine, puesto que el oro no se altera con el tetróxido de osmio y la plata sí. Para el virado al oro, primero se incubó en solución de cloruro de oro al 0,05% en agua destilada y, seguidamente, se incubó en tiosulfato sódico al 0,3% en agua destilada. Ambas incubaciones se realizaron a 4°C en oscuridad (10 minutos cada una).

- 3 lavados en PB 0,1 M (10 minutos).
- Postfijación con tetróxido de osmio al 1% en PB 0,1 M a 4°C y en oscuridad durante 20 minutos. El protocolo de postfijación, deshidratación e inclusión en resina continuó como se indica en el apartado 2.6.2.

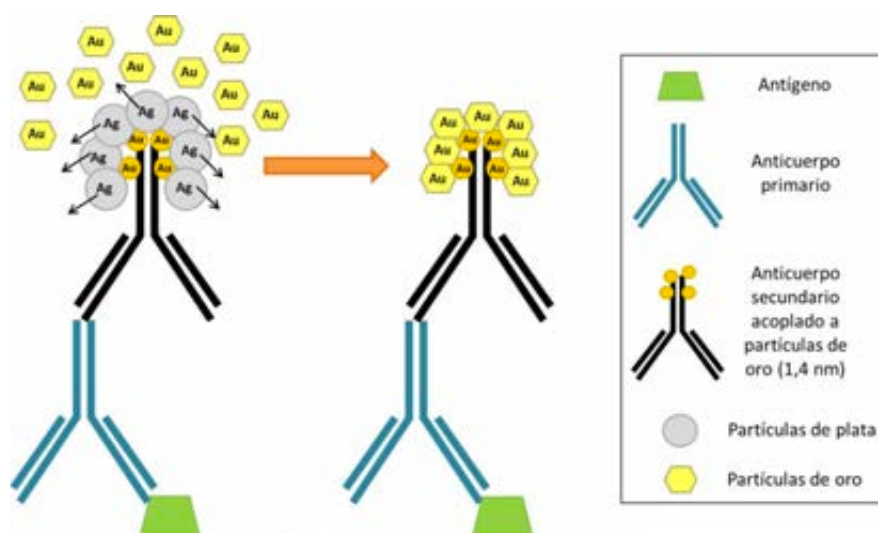


Figura 2.6. Esquema de la técnica inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión. El antígeno es reconocido de forma específica por el anticuerpo primario, y éste a su vez por el anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 1,4 nm. La señal se amplifica gracias a la unión de partículas de plata, que posteriormente son sustituidas por partículas de oro (viraje al oro).

Tabla 2.9. Anticuerpos secundarios conjugados con oro empleados en inmunomarcaje para microscopía electrónica de transmisión.

Anticuerpo secundario	Dilución de uso	Tiempo y temperatura de incubación	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
Anti-IgG de cabra	1:100	24h, 22°C	Conejo	NanoProbes, ref. 2005
Anti-IgG de conejo	1:100	24h, 22°C	Cabra	NanoProbes, ref. 2004
Anti-IgG de oveja	1:100	24h, 22°C	Conejo	NanoProbes, ref. 2050
Anti-IgG de rata	1:100	24h, 22°C	Cabra	NanoProbes, ref. 2007
Anti-IgG de ratón	1:100	24h, 22°C	Cabra	NanoProbes, ref. 2001

2.6.6. OBSERVACIÓN Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE MET

Para la observación de los cortes ultrafinos se empleó un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1400) (Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga). En este microscopio se tomaron fotografías en formato .tiff y con un tamaño de 1336x1336 píxeles. Al igual que las imágenes de microscopía óptica, las imágenes de MET fueron procesadas mediante el programa Adobe Photoshop CS2 (tamaño, brillo, contraste) y montadas en láminas empleando el software Microsoft Office PowerPoint 2010.

2.7. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN

2.7.1. ANÁLISIS DE LA CARGA AMILOIDE Y LA CARGA MICROGLIAL

La carga amiloide es el porcentaje del área de una región concreta ocupada por las placas amiloides extracelulares. El análisis de este parámetro se realizó mediante marcaje de las placas con anticuerpos específicos para A β (anti-A β ₄₂, anticuerpo OC) para visualizar la totalidad de las placas, o bien mediante la tinción de Tioflavina-S para las placas fibrilares. La carga microglial es el porcentaje del área de una región ocupada por células microgliales inmunopositivas para marcadores específicos (Iba1, CD45, TREM2, galectina 3, o ferritina). Estas cuantificaciones fueron realizadas en el hipocampo completo, en la región CA1 y en el subículo.

Mediante el microscopio Nikon (modelo Eclipse 80i) y el programa ACT-2U, se tomaron imágenes a campo claro de los preparados de inmunohistoquímica. Para la toma de imágenes de los preparados teñidos con Tioflavina-S se empleó el microscopio de epifluorescencia Olympus BX61 y el programa Cell-A (Olympus). Para cada cuantificación, las imágenes fueron tomadas a 10x bajo las mismas condiciones de luz, brillo y contraste y fueron procesadas mediante el programa Visilog 6.3 (Noesis) (**figura 2.7**). Primero se calibró la imagen empleando una escala 10x. La imagen fue transformada a escala de grises y se estableció el umbral adecuado entre 0 y 255 para la detección de las placas amiloides/células microgliales, el cual se mantuvo durante cada una de las cuantificaciones. Así, se obtuvo una imagen binarizada en la que solo aparecían las zonas teñidas. A continuación, se dibujó el área de interés (hipocampo, CA1 o subículo) y se obtuvo la imagen binarizada de dicha región. Se sumaron las dos imágenes binarizadas y se obtuvo una imagen en la que solo aparecían las zonas teñidas que se encontraban dentro de la región de estudio. Finalmente, se midió el área total ocupada por la región y el área ocupada por la tinción dentro de la región.

$$\text{Carga amiloide/glial (\%)} = \frac{\text{área teñida dentro de la región}}{\text{área total de la región}} \times 100$$

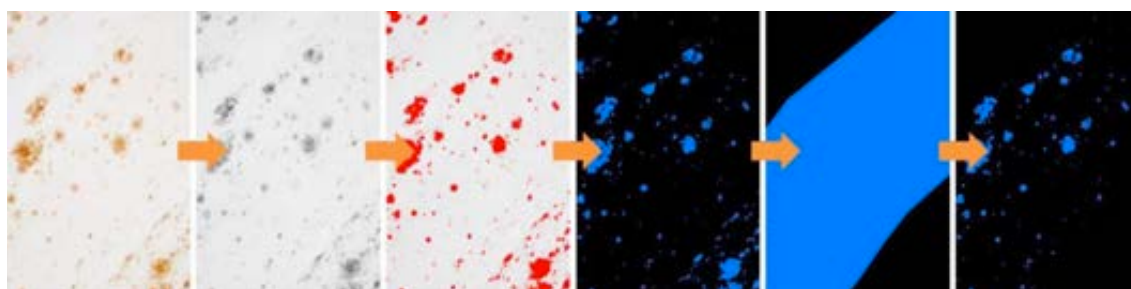


Figura 2.7. Procedimiento para la cuantificación de la carga amiloide/glial mediante el programa Visilog 6.3 (Noesis). La imagen fue transformada a escala de grises y, a continuación, se estableció un umbral de detección para obtener una imagen binarizada de la zona teñida. Después, se dibujó el área de interés y se binarizó. La suma de las dos imágenes binarizadas dio lugar a una imagen en la que aparecía el área teñida dentro de nuestra región de estudio.

2.7.2. NÚMERO Y TAMAÑO DE PLACAS AMILOIDES

Para el cálculo del número y tamaño de las placas amiloides, se emplearon dos metodologías. Por un lado, para las cuantificaciones realizadas en la Universidad de Málaga

(capítulo 3.1) se empleó el software Visilog 6.3 (Noesis). Por otro lado, para las cuantificaciones llevadas a cabo en la Universidad de California Irvine (capítulo 3.3) se utilizó el software Imaris 7.2.3 (Bitplane Scientific Software).

Número y tamaño de las placas mediante Visilog 6.3

Mediante el programa Visilog 6.3 (Noesis), se realizó un estudio del número y el tamaño de las placas amiloides en CA1, empleando el marcador Tioflavina-S, que se une a las placas fibrilares. Para ello, se empleó el mismo protocolo explicado en el [apartado 2.7.1](#), pero en lugar de medir el área total ocupada por las placas amiloides, el programa midió el área de cada una de las placas de forma individual en la región de estudio. Los depósitos detectados con un tamaño menor de $10\ \mu\text{m}^2$ no fueron contabilizados, puesto que podrían corresponder con A β intracelular. También se midió el área total de la región CA1 para el cálculo de la densidad de placas (placas/ mm^2). Las placas amiloides fueron clasificadas por rangos de tamaño ($<200\ \mu\text{m}^2$, $200\text{-}500\ \mu\text{m}^2$, $500\text{-}1000\ \mu\text{m}^2$, $>1000\ \mu\text{m}^2$) y se calculó el porcentaje de placas de cada rango para las distintas edades analizadas (4, 6, 12 y 18 meses).

Número y tamaño de las placas mediante Imaris 7.2.3

Mediante el programa Imaris 7.2.3 (Bitplane Scientific Software), se realizó un estudio del número y el tamaño de las placas amiloides en el subículo, empleando el marcador Tioflavina-S. Las imágenes fueron tomadas en varios planos focales (*Z-stacks*, distancia de $1\ \mu\text{m}$ entre cada plano) en un microscopio confocal Leica Sp5. En el programa Imaris, primero, se calibraron las imágenes y se delimitó la región de interés. A todas las imágenes se les aplicó el mismo umbral de detección, entre 0 y 255. Mediante la herramienta *surface*, se midió el volumen de cada una de las placas detectadas ([figura 2.8](#)). Los depósitos con un tamaño menor de $10\ \mu\text{m}^3$ no fueron contabilizados. Las placas fueron clasificadas por rangos de tamaño ($<200\ \mu\text{m}^3$, $200\text{-}500\ \mu\text{m}^3$, $500\text{-}1000\ \mu\text{m}^3$, $>1000\ \mu\text{m}^3$) para la comparación del número de placas de cada tamaño entre las distintas condiciones experimentales (inyección con PBS/fracciones solubles).

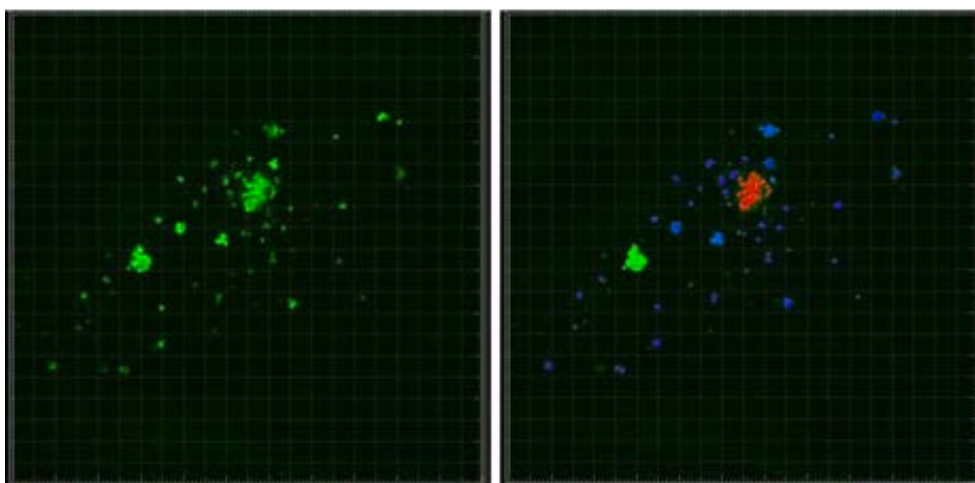


Figura 2.8. Procedimiento para la cuantificación del número y tamaño de las placas amiloides mediante el software Imaris 7.2.3 (Bitplane Scientific Software). Tras delimitar la región de estudio y establecer un umbral de detección adecuado, se empleó la herramienta *surface* para la medida del volumen de cada una de las placas amiloides.

2.7.3. ANÁLISIS DE LA CARGA MICROGLIAL PERIPLACA

Para determinar posibles cambios con la edad en el nivel de recubrimiento de las placas amiloides por parte de la microglía, se analizó la carga microglial periplaca a partir de secciones con triple marcaje fluorescente con Tioflavina-S, anti-ferritina y anti-CD45. Las placas amiloides analizadas fueron seleccionadas al azar en la región CA1 del hipocampo. Para la toma de imágenes de las placas, se mantuvieron los mismos parámetros en el microscopio láser confocal para todas las muestras. Las imágenes fueron tomadas en varios planos Z (*Z-stacks*), con una distancia de 1 μm entre cada plano focal. Empleando la proyección máxima (suma de planos focales) de cada placa amiloide, se cuantificó la carga glial periplaca mediante el programa Visilog 6.3 (Noesis).

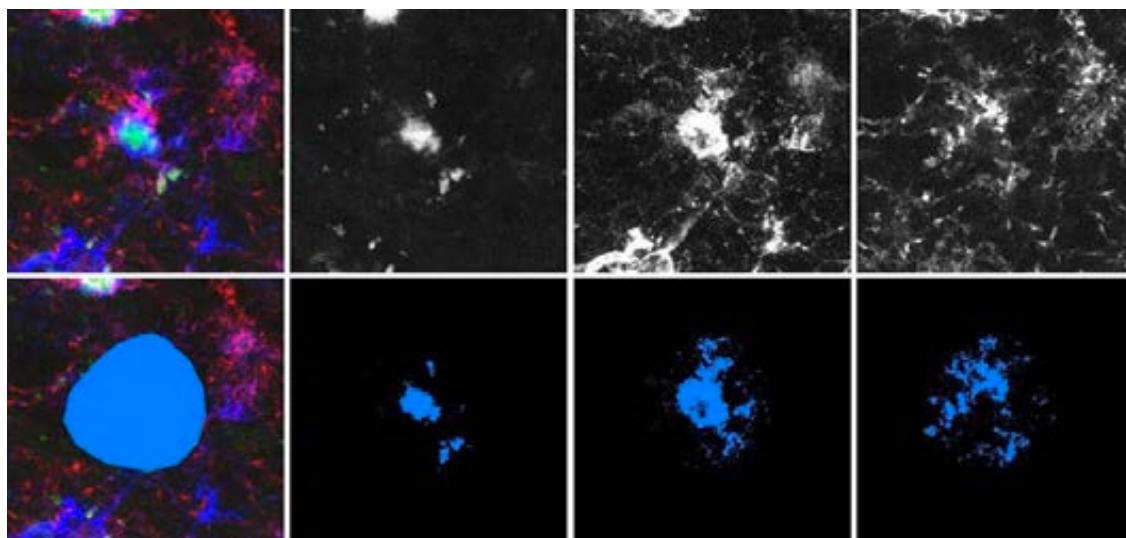


Figura 2.9. Procedimiento para el cálculo de la carga glial periplaca mediante el programa Visilog 6.3 (Noesis). La imagen con el triple marcaje (proyección máxima) se transformó a escala de grises y separaron los canales verde, azul y rojo. Se establecieron los umbrales de detección para obtener una imágenes binarizadas de cada marcador. A continuación, se dibujó el área de interés total (core + corona glial) y se obtuvo una imagen binarizada. Se sumaron las imágenes binarizadas de cada marcador con la imagen binarizada del área de interés total. Así, se obtuvo una imagen binarizada en la que solo aparecen las zonas teñidas (TioS, Ferritina y CD45) dentro de la región de estudio.

Con el programa de análisis de imagen, primero se calibró la escala de la imagen y, a continuación, se transformó a escala de grises, separándose los canales verde (TioS), azul (ferritina) y rojo (CD45). Se establecieron umbrales adecuados (de 0 a 255) para la detección de la placa amiloide, la marca ferritina-positiva y la marca CD45-positiva. Estos umbrales se mantuvieron durante toda la cuantificación. Así, se obtuvo una imagen binarizada en la que solo aparecían las zonas teñidas para cada uno de los marcadores por separado (TioS, ferritina y CD45). Tras esto, se dibujó nuestra área de interés, formada por el core de la placa y la corona glial que lo rodea, y se obtuvo la imagen binarizada. Se sumaron las imágenes binarizadas de cada uno de los marcadores y del área de interés, obteniéndose una imagen en la que solo aparecían las zonas teñidas que se encontraban dentro de la región de estudio (**figura 2.9**). Finalmente, se midió el área total de nuestra región de interés (core + corona glial), y el área dentro de ésta ocupada por la marca TioS-positiva, ferritina-positiva y CD45-positiva. Estas áreas se multiplicaron por el grosor en Z para obtener una medida en volumen. Con estos datos, se calculó el porcentaje de volumen ocupado por cada uno de los marcadores

respecto al volumen total del core y la corona glial (carga o *loading* glial periplaca). Además, se calcularon los ratios de los volúmenes CD45/TioS, Ferritina/TioS y Ferritina/CD45. Estos parámetros se analizaron tanto en base a las placas totales como dividiéndolas por rangos de tamaño ($<500 \mu\text{m}^3$, $500-1000 \mu\text{m}^3$, $>1000 \mu\text{m}^3$).

2.7.4. ANÁLISIS DEL HALO OLIGOMÉRICO DE LAS PLACAS AMILOIDES

Las placas amiloides fibrilares presentan un core Tioflavina-S positivo rodeado de un halo oligomérico positivo para el anticuerpo OC ($A\beta$ oligomérico prefibrilar). Con el fin de estudiar la evolución con la edad del halo oligomérico de las placas amiloides, se emplearon muestras de animales APP/PS1 inmunoteñidas con el marcador OC y teñidas con Tioflavina-S. Se tomaron imágenes de placas al azar en la región CA1 hipocampal mediante microscopía láser confocal. Estas imágenes fueron procesadas empleando el programa Leica LAS AF lite (Leica Microsystems). En cada placa se delimitaron el núcleo fibrilar (TioS-positivo) y el perímetro OC-positivo (**figura 2.10**), y el programa calculó el área de las dos figuras dibujadas en μm^2 . El halo oligomérico de la periferia forma un anillo que rodea al núcleo fibrilar de la placa. Por ello, para calcular el tamaño del halo de cada placa, se aplicó la fórmula siguiente:

$$\text{Área halo} = \text{área OC-positiva} - \text{área TioS-positiva}$$

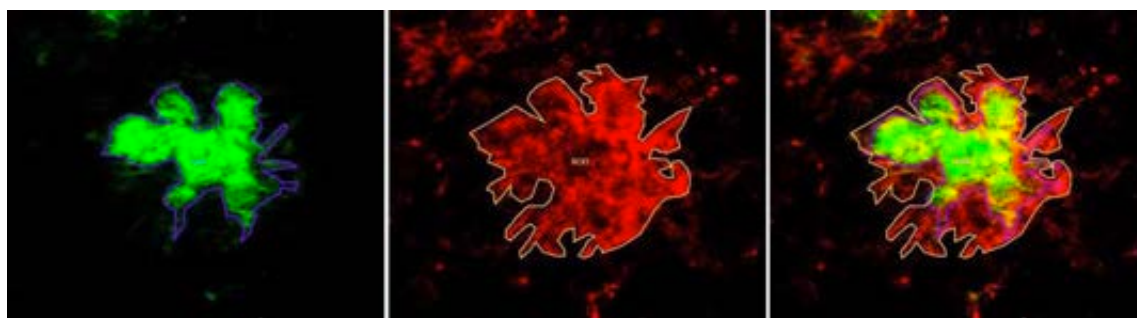


Figura 2.10. Medición del área del halo periférico de las placas amiloides mediante el programa Leica LAS AF lite. Para cada placa analizada, se dibujó el núcleo fibrilar teñido con Tioflavina-S y el área inmunomarcada con el anticuerpo OC. La diferencia entre ambas áreas se correspondía con el halo oligomérico periférico tóxico de dicha placa.

Además de estudiarse la evolución del halo con la edad en las placas totales, las placas también fueron clasificadas por rangos de tamaño del core ($<200 \mu\text{m}^2$, $200-500 \mu\text{m}^2$, $500-1000 \mu\text{m}^2$, $>1000 \mu\text{m}^2$) para determinar cómo variaba el tamaño del halo en función del tamaño de las placas y la edad de los animales.

2.8. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESTEREOLOGÍA

La estereología es una rama de la morfometría que permite la adquisición de información tridimensional y cuantitativa a partir de imágenes bidimensionales, como es el caso de secciones de tejido. Esta técnica combina la probabilidad geométrica y la estadística para cuantificar las propiedades geométricas de objetos de interés, utilizando información adecuadamente muestreada (Howard and Reed 1998, 2004).

En este trabajo, las técnicas estereológicas se han realizado con sistemas de análisis estereológicos computerizados (**figura 2.11**), y se han utilizado para determinar la carga amiloide en el hipocampo (con los marcadores rojo congo y 6E10), y para el estudio de la densidad de la patología neurítica asociada a estas placas (neuritas distróficas APP-positivas).

Para poder llevar a cabo esta técnica, los objetos de interés (placas o distrofias) han de ser muestreados de manera uniforme, es decir, que en un área determinada cada objeto debe tener la misma probabilidad de ser contado. Es necesario delimitar el área de la región a analizar, y determinar el porcentaje de la muestra que se quiere estudiar (entre el 20 y el 50% del total) para que el programa realice un muestreo de la zona, y seleccione aleatoriamente el primer punto. De esta manera, los puntos de muestreo consecutivos, equidistantes, también habrán sido seleccionados al azar, mediante un muestreo en forma de meandro (del inglés, *meander sampling*). Generalmente, la región cerebral de interés se delimita manualmente con el objetivo de 2x o 4x, y el muestreo se realiza con objetivos de mayores aumentos (40x o 100x).

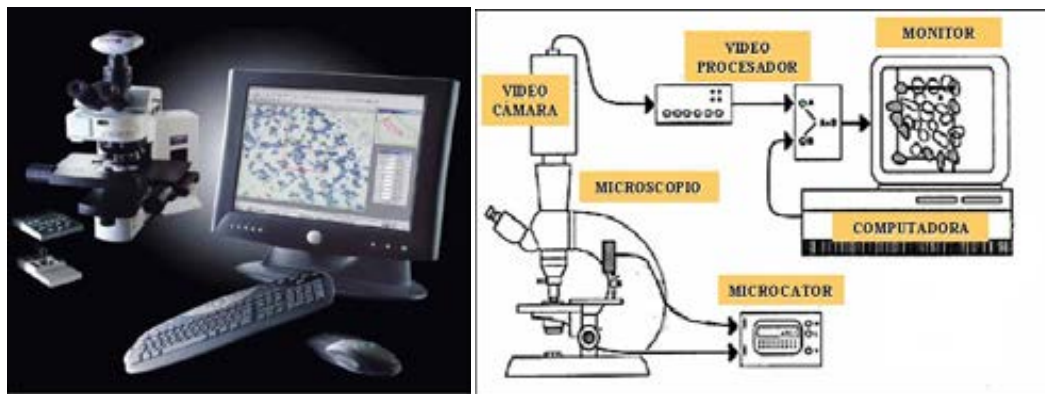


Figura 2.11. Imagen y esquema representativo de los componentes del sistema de análisis estereológico computerizado. Comprende un microscopio convencional, una videocámara digital a color, un programa informático de estereología y un microcator que monitoriza con precisión los movimientos en profundidad (eje Z).

La técnica estereológica del disector óptico permite estimar el número de sujetos de estudio por volumen (células/mm³) o densidades numéricas, y está considerada como el mejor método de muestreo para una estimación precisa. Para la cuantificación de diferentes poblaciones pueden utilizarse dos aproximaciones estereológicas: el fraccionador óptico, que permite obtener una estimación del número total de entidades de una estructura y, por otra parte, el disector óptico, que permite determinar la densidad numérica. Al emplear este estimador hay que tener en cuenta el factor de encogimiento que presenta la región a estudiar.

Fraccionador óptico

El fraccionador óptico es un estimador que resulta de la combinación del disector óptico y un muestreo sistemático de las secciones (el fraccionador) (West et al. 1991). En este estimador, el conteo de partículas se lleva a cabo por el disector óptico, además requiere que las secciones sean uniformes y muestreadas sistemáticamente, puesto que van a constituir una fracción de la región a ser analizada. El fraccionador óptico no se ve afectado por los

encogimientos que pueda sufrir el tejido y puede ser utilizado para secciones congeladas, en vibratomo y en parafina. La fórmula del fraccionador óptico se compone de los siguientes parámetros:

$$\hat{N} = \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{hsf} \times Q$$

ssf: Fracción muestreada de las secciones (figura 2.12).

asf: Fracción muestreada de área (figura 2.13).

hsf: Fracción muestreada en altura (figura 2.14).

Mientras que 'Q', es el número de partículas contadas por individuo.

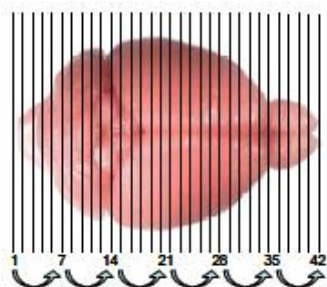
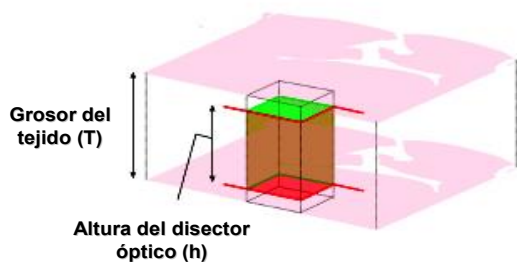
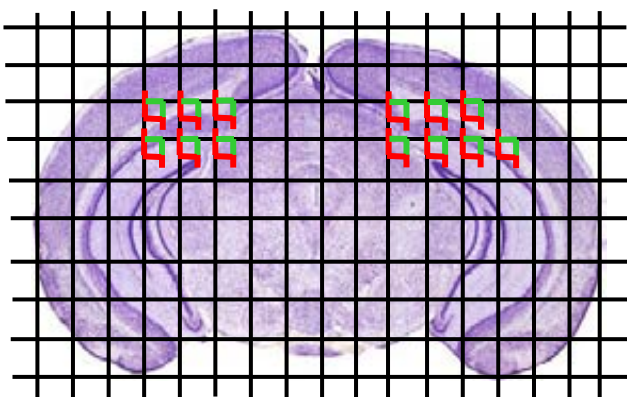


Figura 2.12. ssf: Fracción muestreada de las secciones. La fracción muestreada de las secciones es la proporción entre las secciones analizadas y el total de número de secciones por animal (N secciones). En este caso se analizó 1/7. Las secciones seriadas están separadas una de otra por 280 µm y son muestreadas de forma sistemática (Howard and Reed 1998, 2004).

Figura 2.13. asf: Fracción muestreada de área. Muestreo sistemático. En el muestreo sistemático, la cuantificación no se realiza en todo el tejido, sino que se contarán el número de partículas que se encuentren contenidas en disectores ópticos (áreas específicas de tejido), que se hallan distribuidos sistemáticamente en una plantilla previamente diseñada. La fracción muestreada de área es el cociente entre el área de la ventana de conteo (área del disector óptico) y el área de la cuadrícula (Howard and Reed 1998, 2004).



$$(hsf) = \frac{h}{T}$$

Figura 2.14. hsf: Fracción muestreada de altura. La fracción muestreada de altura, es la razón entre la altura de la ventana de conteo (disector óptico) y la altura de la sección de tejido. Las distancias tanto del disector como de la sección se calcularon con el microcator (Howard and Reed 1998, 2004).

Nucleador: Estimación del tamaño de placas

La *isotropía* se define como la uniformidad en la distribución a lo largo de todas las posibles orientaciones en 2D o 3D. En la práctica se combina siempre con la posición uniformemente aleatoria de los elementos muestreados en el espacio, de manera que el diseño del protocolo de medición sobre una estructura garantice el encuentro isotrópico al azar (IUR, del término inglés, *Isotropic Uniform Random*) entre la sonda de medida y la estructura. En algunos casos, como la esfera, la propia estructura es estadísticamente isotrópica.

El nucleador (Gundersen et al. 1988) se basa en la generación de rayos isotrópicos desde un punto fijo definible (no arbitrario) interior del objeto a medir (por ejemplo, una célula o un depósito amiloide). Si las secciones son IUR, entonces las direcciones de los rayos deben ser isotrópicas en 2 dimensiones (2D). La orientación de una línea viene dada por el ángulo ω que forma relativo a un eje predeterminado y, por lo tanto, por el punto en que corta a una circunferencia imaginaria que, a su vez, representa un ángulo. Es preciso que todos los ángulos tengan igual probabilidad de ocurrir. De modo que para lograr la isotropía en 2D hay que generar al azar un número de ángulos uniformemente distribuido entre 0° y 180° (figura 2.15).

En este trabajo, el nucleador se ha utilizado para determinar el tamaño (área) de las placas congofílicas hipocampales. Tras indicarle al programa cuál es el punto central del objeto a estudiar, esta herramienta produce una malla radial sobre el mismo que garantiza las condiciones necesarias para la IUR, y nos permite establecer los puntos de corte de la malla con el objeto, definiéndose así el área a cuantificar. El número de radios isotrópicos a utilizar será determinado por el usuario ($n=5$ en este estudio) (figura 2.15).

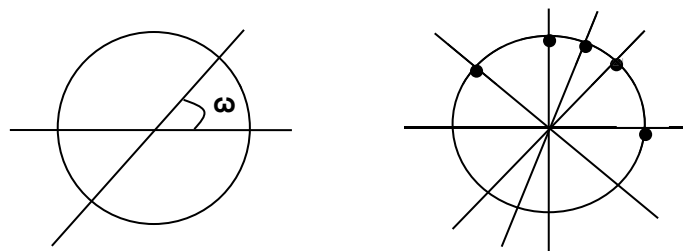


Figura 2.15. Cuantificación del área de las placas mediante el nucleador. Principio de isotropía en el que se basa la técnica del nucleador. Mediante esta metodología, se cuantifican las placas incluidas en los disectores. Para la medida del área se marca el centro de la placa y el punto de corte de los 5 radios con el borde de esta.

2.8.1. CUANTIFICACIÓN ESTEREOLÓGICA DE LA DENSIDAD DE NEURITAS DISTRÓFICAS ASOCIADAS AL PERÍMETRO DE LAS PLACAS AMILOIDES

Para la determinación de la densidad de distrofias positivas para APP asociadas a las placas congofílicas en el modelo APP/PS1, se ha empleado un sistema de computación interactivo que comprende un microscopio convencional (Olympus BX61), una video cámara digital a color (Olympus DT71), el programa informático de estereología New CAST (*Computer Assisted Stereological Tollbox*, Olympus) con el sistema VIS 2.61.1.0. (*Visiopharm Integrator*

System, Visiopharm®) y un microcator (Prior ProScan MT12) que monitoriza los movimientos del eje Z con una resolución de 0,5 µm. Se analizaron una media de 4 secciones por animal con un total de 4 individuos de cada edad.

En este caso, se realizó un muestreo al azar del hipocampo (porcentaje de escaneo del 20%) con el objetivo de 40x. Cada vez que la ventana de conteo localizaba una placa congofílica, su área era determinada usando la aplicación *nucleador IUR 2D* (NewCast, Visiopharm) tal y como se ha comentado en el apartado anterior. Posteriormente, asimilando el perfil bidimensional de las placas a circunferencias, el perímetro (P) de cada depósito congofílico fue calculado a partir de las siguientes fórmulas geométricas básicas:

$$A = \pi r^2 \quad \text{y} \quad P = 2\pi r,$$

siendo *r* el radio medio de cada placa, estimado a partir del área *A*.

A continuación, se calculó la densidad de neuritas distróficas por unidad de longitud (**DL** = número/µm), aplicando una fórmula similar a la de la densidad numérica, aunque sin tener en cuenta la altura del disector:

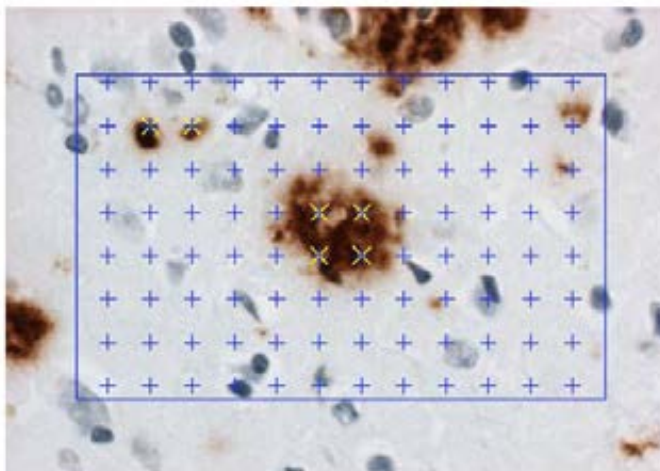
$$DL = \frac{\Sigma N}{\Sigma P (\mu m)},$$

siendo **N** el número de neuritas APP-positivas alrededor de cada placa, y **P** el perímetro del depósito congofílico.

2.8.2. CUANTIFICACIÓN ESTEREOLÓGICA DE LA CARGA AMILOIDE EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO hAβ-KI

La determinación de la carga de Aβ en los animales hAβ-KI y 3xTgAD inyectados con extractos corticales de pacientes de Alzheimer (Braak VI) ha sido realizada durante el periodo de estancia en el laboratorio del Dr. Frank LaFerla en la UCI (University of California Irvine, EEUU). Para esta cuantificación se ha empleado el programa informático *Stereoinvestigator* junto con la aplicación *Area Fraction Fractionator probe* (Microbrightfield, EEUU). Esta herramienta superpone un espacio virtual bidimensional, usualmente un rectángulo, sobre la región de interés aplicando las bases necesarias para garantizar un muestreo aleatorio sistemático. En cada caja de muestreo se dispone una batería de puntos (**figura 2.16**). El número de puntos ubicados sobre las placas amiloides es dividido por el número total de puntos de la región de referencia de modo que se puede obtener una estimación del porcentaje en volumen del tejido que es ocupado por las placas. De este modo se pudo estimar la fracción de una región (hipocampo) ocupada por una subregión (depósitos de Aβ inmunomarcados con 6E10).

Figura 2.16. Area Fraction Fractionator Probe. Los puntos ubicados sobre la subregión a estudiar (en este caso los depósitos de A β) aparecen en color amarillo. Los puntos ubicados sobre la región de referencia se muestran en color azul. Para esta cuantificación usamos un tamaño de ventana de conteo de 200 mm x 200 mm, con una distancia entre ventanas de 300 mm x 300 mm, tamaño de cuadrícula de conteo de 15 mm y un objetivo 10x.



$$V_v(Y, ref) = \frac{\Sigma P(Y)}{\Sigma P(ref)}$$

$V_v(Y, ref)$: porcentaje en volumen del tejido de referencia ocupado por la subregión.

$P(ref)$: puntos en el volumen de referencia.

Y : subregión.

$P(Y)$: puntos en la subregión.

2.9. ANÁLISIS METABOLÓMICO MEDIANTE HR-MAS RMN

Para este estudio, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Rápidamente, se extrajeron los cerebros en fresco y se diseccionó la corteza cerebral y el hipocampo con unas pinzas y una hoja de bisturí. La disección se realizó sobre una placa metálica con hielo debajo, de este modo, se mantuvo una temperatura baja para retrasar la degradación del tejido. El tejido se conservó a -80°C hasta su uso.

Las muestras de corteza e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT fueron analizadas mediante espectroscopía de protones por resonancia magnética de alta resolución en ángulo mágico (HR-MAS RMN, *High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*). Este análisis fue realizado por la Unidad de Nanoimagen del BIONAND (Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología). La técnica HR-MAS RMN permite detectar los protones de las moléculas presentes en el tejido. Esta técnica puede realizarse en tejido sólido gracias a que la muestra se gira en un ángulo mágico con respecto a la dirección del campo magnético. La HR-MAS RMN permite estimar la concentración de diversos metabolitos en las muestras de tejido analizadas.

Todos los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Advance™ 600MHz, equipado con una sonda para espectroscopía de

alta resolución por ángulo mágico (HR-MAS) y con una unidad de control (BCU, Bruker Cooling Unit) que permite la obtención de los espectros a 4°C. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- **Adquisición de los espectros de disoluciones modelo.** En primer lugar, se adquirieron espectros modelo para configurar una base de datos de conocimiento a priori que será utilizada para llevar a cabo el análisis cuantitativo mediante combinación lineal de los mismos, utilizando el programa LCModel (Linear Combination of Model Spectra, Provencher 1993). La adquisición de los espectros modelo se llevó a cabo en un equipo Bruker Avance III 600 MHz, dotado con una sonda triple $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ de HR-MAS (*high resolution-magic angle spinning*). Se adquirieron espectros monodimensionales empleando secuencias de pulso/adquisición (zg) y de eco de espín (CPMG) a tiempo de eco de 144, ambas con presaturación de agua. En todos los casos las muestras se giraron a 5kHz formando un ángulo de 54,7° (ángulo mágico) respecto al campo principal (B_0), y la temperatura se mantuvo a 4°C. Para la adquisición de los espectros modelo se prepararon las siguientes disoluciones, siguiendo las indicaciones dadas en el manual del programa LCModel: Acetato (Act), Alanina (Ala), Aspartato (Asp), Betaína (Bet), Colina (Cho), Fosforilcolina (PC), Glicerolfosforilcolina (GPC), Citrato (Cit), Creatina (Cr), Fosfocreatina (PCr), Ácido gamma-aminobutírico (GABA), Glicina (Gly), Glucosa (Glc), Glutamina (Gln), Glutamato (Glu), Glutación (GSH), Isoleucina (Ile), Lactato (Lac), Leucina (Leu), Myo-Inositol (Myo-Ins), Scyllo-Inositol (Scyllo-Ins), Fenilalanina (Phe), Fosfoetanolamina (PE), N-acetil aspartato (NAA), N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG), Piruvato (Pyr), Succinato (Suc), Taurina (Tau), Treonina (Thr), Valina (Val). A esta base de datos de metabolitos pequeños se añadieron además las señales, mediante simulación espectral, correspondientes a macromoléculas y lípidos.
- **Preparación de muestras.** Las muestras de tejido intacto se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su preparación. En el momento del análisis se descongelaron e inmediatamente se colocaron en insertos de HR-MAS (5-20 mg de tejido) y se añadieron 30 μl de tampón fosfato preparado en agua deuterada, que permite el bloqueo de campo (lock) utilizando la señal del deuterio. Los insertos se colocaron en un rotor de zirconio y se introdujeron dentro de la sonda de HR-MAS para la adquisición de los espectros.
- **Adquisición de los espectros de biopsias.** Los espectros de las biopsias de tejido nervioso se adquirieron utilizando las condiciones descritas en el apartado anterior. La temperatura a 4°C en este caso es fundamental ya que evita la degradación del tejido e impide alteraciones metabólicas debidas a actividad enzimática. Además de los espectros monodimensionales (zg y CPMG), se adquirieron espectros 2D ^1H -COSY y 2D resueltos en J, para ayudar a la correcta asignación de las señales en las regiones de mayor solapamiento.
- **Análisis cuantitativo.** El análisis cuantitativo de los datos se llevó a cabo de manera automatizada empleado el programa LCModel. Brevemente, el programa LCModel calcula el espectro que mejor se ajusta al experimental mediante la combinación lineal de los espectros modelo de la base de datos correspondiente, lo que proporciona valores de concentración relativos. Para llevar a cabo una cuantificación absoluta es necesario disponer de una referencia interna. En nuestro caso utilizamos una señal

generada electrónicamente (ERETIC, *Electronic REference To access In vivo Concentrations*). Brevemente, el método consiste en producir una señal de radiofrecuencia sintética que se pre-calibra con respecto a una referencia. De esta manera se evitan los problemas derivados de otros sistemas de referencia interna, como el TSP, por ejemplo, que en el caso de la espectroscopía de HR-MAS plantea la duda de su localización, intra o extracelular, por un lado, y de la concentración real final, ya que una parte puede perderse fácilmente durante la manipulación de la muestra.

2.10. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

2.10.1. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE LA MICROGLÍA ACTIVA EN RATONES APP^{751SL}

Este estudio fue realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla/IBIS) con el fin de analizar la expresión de genes relacionados con la activación microglial en animales APP^{751SL} jóvenes (3 meses) y viejos (12 meses).

Aislamiento de la microglía activa

Para este procedimiento, los animales fueron anestesiados y perfundidos transcardialmente con PBS 0,1 M. Se extrajeron los cerebros y se aislaron la corteza y el hipocampo. A continuación, se realizó una digestión mecánica con micropipeta, seguida de una digestión química (37°C, 30 min, 400 rpm) con papaína 8 U/ml en presencia de DNaseI 400 U/ml, en un tampón Krebs-Ringer tamponado con PIPES a pH 7,4 (EDTA 0,6mM, L-Cisteína 3 mM, Glucosa 0,45%, NaCl 0,12M, KCl 5mM, NaOH 40mM y PIPES 6mg/ml). La papaína se inactivó con BSA 0,5% en DMEM-F12 a 37°C durante 15 minutos, 400 rpm. Posteriormente, se terminó de disgregar el tejido con una micropipeta y se filtró con filtro de nylon de 100µm de diámetro. La suspensión de células se lavó y resuspendió en la solución de BSA 0,5% en DMEM-F12, y se depositó cuidadosamente sobre Percoll al 90% preparado en HBSS 1x para generar un gradiente. Mediante centrifugación (200xg, 15 minutos, sin freno), la suspensión celular se separó en 3 fases: en la fase acuosa superior quedaron los restos celulares, en la fase intermedia se generó una fase de mielina y células, y en la fase inferior quedaron las demás células en suspensión. Por tanto, se retiró la fase superior para descartar todos los restos celulares, y se mezcló la fase intermedia con la inferior, que se lavó de nuevo con la solución de BSA 0,5% en DMEM-F12 y se centrifugó (200xg, 15 minutos, sin freno). En el precipitado obtenido teníamos todos los tipos celulares presentes en la corteza e hipocampo.

Para aislar específicamente microglía, se marcó la suspensión de células con los anticuerpos microgliales anti-CD45-PE (clon HI30, Immunostep) y anti-CD11b-CFBlue (clon M1/70, Immunostep). También se empleó el anticuerpo anti-Clec7a (FAB14561Gm, R&D Systems), que nos permitió diferenciar la microglía activa. Se lavó y se separaron las células mediante el Separador Celular FACS Aria Fusion (Becton Dickinson), que detecta las diferentes poblaciones según la expresión de cada marcador. En primer lugar, se realizó una selección de células individuales (población P1), mediante la representación de SSC (Side Scatter) frente a

FSC (Forward Scatter), que proporciona información sobre la complejidad y el tamaño celular, respectivamente, y permite descartar todos los restos celulares y restos de mielina. Seguidamente, se descartaron los dobletes y se seleccionaron las células individuales (población P2), que muestran una relación lineal en la representación FSC-H vs. FSC-A. En tercer lugar, mediante inmunomarcajes fluorescentes se distinguieron poblaciones claramente definidas, donde la población CD45+/CD11b+ correspondía a las células microgliales. Dentro de la población microglial, se distinguieron las células Clec7a- como microglía no activa y las células Clec7a+ como microglía activa (**figura 2.17**).

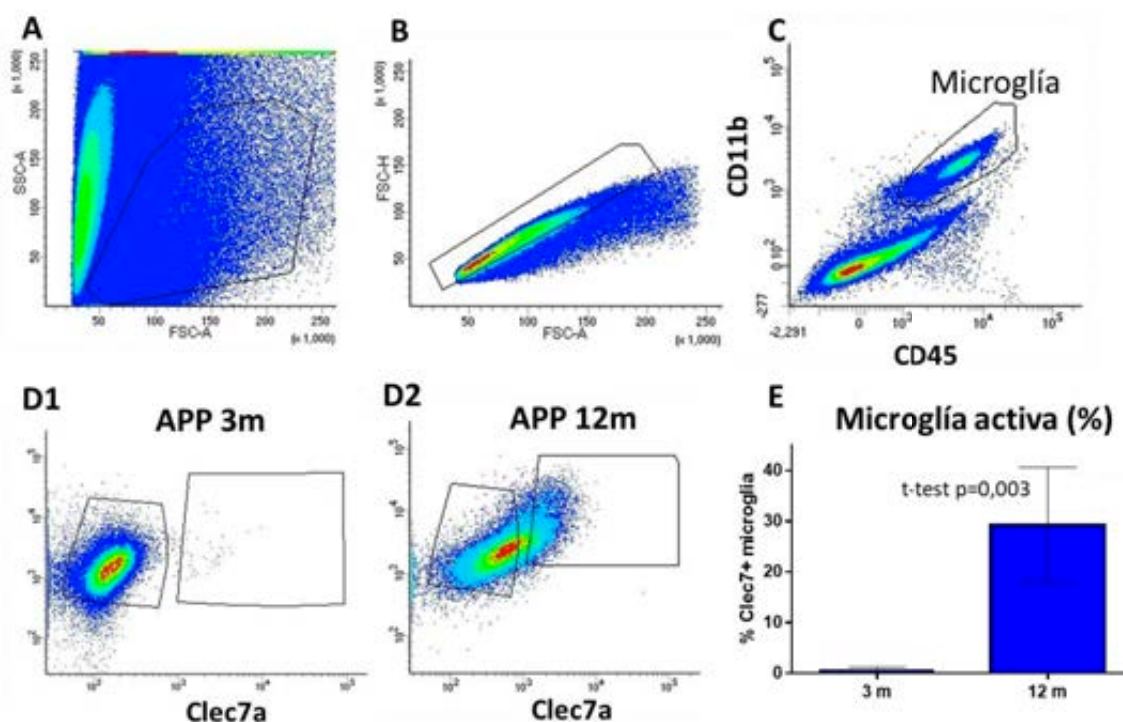


Figura 2.17. Proceso de aislamiento de la microglía activa a partir del tejido de ratones APP de 3 y 12 meses de edad. Primero se seleccionaron las células por tamaño y complejidad (A) y, a continuación, se seleccionaron las células individuales (B). Las células microgliales se identificaron y seleccionaron gracias a que eran positivas para CD11b y CD45 (C). A 3 y 12 meses de edad se seleccionó la microglía activa mediante el marcador Clec7a (D1-2). La proporción de microglía activa fue mucho mayor a 12 meses de edad (E).

Extracción del ARN

A continuación, se realizó la extracción de ARN, que se basa en las diferencias de solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos. A las muestras de microglía activa aislada se les añadió 1 ml de Tripure® por cada 50-100 mg, y se homogeneizó la muestra durante 20 segundos. Para disociar los complejos núcleo-proteínas, se incubó el homogeneizado durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Tripure®. La mezcla se agitó y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se centrifugó a 12000g durante 15 minutos, a 4°C. Se obtuvo una solución con 3 fases: fase superior acuosa en la que se encuentra el ARN, interfase en la que se encuentra el ADN y fase inferior que contiene las proteínas. Para obtener el ARN, extrajo la fase superior acuosa y se realizó una precipitación con 0,5 ml de isopropanol por cada ml inicial de Tripure® durante 10 minutos. Por último, el

ARN precipitado se purificó mediante el sistema ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems). Seguidamente, el ARN purificado se cuantificó mediante un espectrofotómetro y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

Para comprobar la integridad del ARN purificado se empleó el *Agilent RNA 600 Nano Kit* como soporte electroforético y *Agilent 2100 Bioanalyzer* como instrumento de detección y análisis. Este sistema origina un electroferograma (fluorescencia/tiempo) que permite conocer la calidad del ARN generado mediante un software especializado, el RIN (*RNA Integrity Number*). Así se clasificó numéricamente la calidad del ARN desde 1, ARN totalmente degradado, hasta el 10 que corresponde al ARN perfectamente conservado.

Estudio transcriptómico mediante array

Para el estudio transcriptómico, se utilizó el array de hibridación *Clariom™ S Pico Assay mouse* (ThermoScientific) en el Servicio de Genómica y Secuenciación del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Los datos se normalizaron usando el método RMA (*Robust Multi-Array*), y el análisis de expresión diferencial y de enriquecimiento en rutas se realizó usando el software TAC (*Transcriptome Analysis Console*; Affymetrix, ThermoScientific) y el sistema GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), mediante *Gene Ontology* (GO).

2.10.2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES SOLUBLES

Con el fin de realizar inyecciones intracerebrales de A β en animales *in vivo*, se aislaron las proteínas solubles extracelulares y citosólicas mediante la ultracentrifugación diferencial. Para ello, se emplearon muestras de cerebro de ratón (hipocampo) y cerebro humano (hipocampo y corteza) extraídas en fresco y conservadas a -80°C hasta el momento de su uso, para evitar la degradación de proteínas.

En colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla, IBiS), se llevó a cabo el aislamiento de las fracciones solubles de hipocampo de ratones APP/PS1 de 18 meses y de pacientes con EA (Braak V-VI). Estas fracciones solubles se emplearon en las inyecciones realizadas en el objetivo 3.1 de esta tesis, llevado a cabo en la Universidad de Málaga. Para el aislamiento de estas fracciones solubles (Jimenez et al. 2014), el tejido fresco se disgregó manualmente en tampón Tris-salino (cloruro sódico 140mM en Tris-clorhídrico 20mM, pH 7.4 1:5 p/v) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (fluoruro sódico 50mM y ortovanadato sódico 1mM). A continuación, se pasó la suspensión de tejido a un homogeneizador Dounce's (Wheaton), sometiéndolo a 15 pases con el pistilo de menor diámetro (paso de luz: 0.089-0.14mm) y 15 pases con el de mayor diámetro (paso de luz: 0.025-0.076mm). El homogeneizado resultante se ultracentrifugó a 100000 x g durante 1 hora a 4°C (Optima Max, Beckman Coulter). Tras la ultracentrifugación, el sobrenadante obtenido contenía la fracción soluble y el precipitado los restos de membranas, agregados proteicos y proteínas insolubles. Las fracciones solubles se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Durante la estancia en la Universidad de California Irvine, se extrajo la fracción soluble de corteza frontal de un paciente Braak VI, que posteriormente se empleó para inyectar intracerebralmente en animales hA β -KI y 3xTgAD (objetivo 3.2). Para la obtención de estas

fracciones solubles, primero el tejido fresco de los pacientes se disgregó manualmente en PBS 10% (p/v) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. A continuación, el tejido se homogeneizó durante 20 segundos (PowerGen 125 Homogenizer, Fisher Scientific) y luego se sonicó 3 veces durante 5 segundos a 125W, a 20Hz y a una amplitud del 40%. Por último, se ultracentrifugó a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C (Optima TLX, Beckman Coulter). El sobrenadante, que contenía la fracción soluble, se guardó a -80°C hasta su uso.

Las fracciones solubles aisladas del cerebro de pacientes con EA y de ratones transgénicos fueron analizadas mediante *western blot* y *dot blot*. Además, se estudió la capacidad de las fracciones solubles de inducir la fibrilación de A β mediante un ensayo de agregación.

2.10.3. ENSAYO DE PROTEÍNAS. MÉTODO DE BRADFORD

Para el cálculo de la concentración de proteínas en las fracciones solubles se realizó un ensayo colorimétrico según el método de Bradford. Este se basa en el cambio de color del colorante azul de Coomassie en función de la concentración de proteínas. Este colorante presenta color rojo, pero cuando se une a proteínas se convierte en azul, ya que la unión a aminoácidos de carácter básico produce un cambio en su máximo de absorción, que pasa de 465 nm a 595 nm.

Para estimar la concentración de proteínas de nuestras muestras, es necesario realizar una curva patrón con los valores de absorbancia de soluciones de proteínas de concentración conocida. De este modo, se pueden interpolar los datos de absorbancia obtenidos posteriormente en nuestras muestras. La curva patrón se realizó en una placa multipocillo, realizando diluciones a partir de una solución de BSA 0,2 mg/ml. En distintos pocillos, se añadieron 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 μ l de BSA, agua destilada hasta llegar a 160 μ l y 40 μ l de colorante, teniendo un volumen final de 200 μ l. Por otra parte, preparamos nuestras muestras, mezclando 0,5 μ l de fracción soluble, 159,5 μ l de agua destilada y 40 μ l de colorante. Se realizaron tres réplicas de la curva patrón y de las muestras. Se dejó incubar durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm (*Multiskan Ascent plate reader*, Labsystems). Al interpolar los datos obtenidos en nuestras muestras con la ecuación procedente de la curva patrón, obtuvimos la concentración de proteínas de nuestras fracciones solubles en μ g/ μ l.

2.10.4. WESTERN BLOT

La técnica *western blot* permite cuantificar niveles de proteínas específicas en nuestras muestras empleando anticuerpos contra dichas proteínas. En primer lugar, es necesario separar las proteínas en nuestras muestras según su peso molecular. Para ello, se realiza electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes. En estos geles, las proteínas de alto peso molecular recorren a una distancia inferior que aquellas con de bajo peso molecular.

Previamente a la electroforesis, se había calculado la concentración de proteínas en las fracciones solubles (método de Bradford). Las muestras se prepararon ajustando la cantidad de proteínas a cargar en el gel (10 μ g) y se mezclaron el tampón reductor 1x (*NuPAGE Sample Reducing Agent* 10x) y el tampón de carga 1x (*NuPAGE LDS Sample Buffer* 4x) en agua

destilada. La mezcla se calentó a 80°C durante 5 minutos y posteriormente se cargó un volumen de 15 µl en un gel de tricina al 16% en tampón MES diluido a 1x (*running buffer*). Las muestras se corrieron en el gel a un voltaje constante de 140V.

Una vez realizada la separación mediante electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa empleando el sistema *iBlot2 Gel Transfer Device* (ThermoFisher). La membrana se lavó con TBS-T (**ver apéndice 2.13.2**) durante un minuto y se bloqueó con BSA al 5% en TBS-T durante una hora. A continuación, se incubó en el anticuerpo primario diluido en BSA 5% en TBS-T durante una noche a 4°C. Los anticuerpos empleados, las diluciones y las referencias se indican en la **tabla 2.10**.

Tabla 2.10. Anticuerpos primarios empleados en *western blot*.

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
6E10 (anti-Aβ1-17)	1:1000	Ratón	Covance, ref. SIG-39320
82E1 (anti-Aβ1-16)	1:1000	Ratón	Immuno-biological Laboratories Co., ref. 10323

Tras la incubación en anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TBS-T. A continuación, se incubó en el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) (Invitrogen, ref. 31430). El anticuerpo secundario se incubó a 1:7000 diluido en BSA 5% en TBS-T durante una hora. Tras esto, se realizaron 4 lavados con TBS-T y la membrana se incubó en el líquido de revelado (*SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate*) en oscuridad durante 5 minutos. La enzima HRP da lugar a un producto quimioluminiscente en presencia del líquido de revelado, cuya señal es proporcional a la cantidad de proteína específica en la muestra. La señal se reveló en películas de rayos X (*Premium Clear Blue X-ray Film*) empleando el sistema de captación *AFP Mini Med X-Ray Film Processor* (AFP manufacturing).

2.10.5. DOT BLOT

El ensayo *dot blot* permitió detectar la presencia de proteínas específicas en las fracciones solubles, sin separarlas previamente por tamaños. Para esta técnica, se emplearon también membranas de nitrocelulosa. Se puso una gota de muestra con una cantidad conocida de proteínas (3 µg) sobre la membrana y se dejó secar durante 30 minutos. La membrana se lavó con TBS-T durante 10 minutos y, a continuación, con tampón de bloqueo (BSA al 5% en TBS-T) durante una hora. Tras esto, se incubó en el anticuerpo primario diluido en BSA 5% en TBS-T, durante una noche a 4°C. Los anticuerpos empleados, las diluciones y las referencias se indican en la **tabla 2.11**.

Tabla 2.11. Anticuerpos primarios empleados en *dot blot*.

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
6E10 (anti-Aβ1-17)	1:1000	Ratón	Covance, ref. SIG-39320
OC (anti- Aβ oligomérico prefibrilar)	1:1000	Conejo	Millipore, ref. AB2286
A11 (anti- Aβ oligomérico soluble)	1:500	Conejo	Cedido por el Dr. Charles G. Glabe

Tras la incubación en anticuerpo primario, se siguieron los mismos pasos que para el *western blot*. La membrana se lavó tres veces con TBS-T y se incubó en el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) (ver tabla 2.12), diluido en BSA 5% en TBS-T durante una hora. A continuación, se realizaron 4 lavados con TBS-T y la membrana se incubó en el líquido de revelado (*SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate*) en oscuridad durante 5 minutos. La señal se reveló en películas de rayos X (Premium Clear Blue X-ray Film) mediante el sistema de captación AFP Mini Med X-Ray Film Processor (AFP manufacturing).

Tabla 2.12. Anticuerpos secundarios empleados en *dot blot*.

Anticuerpo secundario	Dilución de uso	Animal de obtención	Casa comercial y referencia
Anti-IgG de ratón	1:7000	Cabra	ThermoFisher, ref. 31430
Anti-IgG de conejo	1:7000	Cabra	ThermoFisher, ref. 31460

2.10.6. ENSAYO DE AGREGACIÓN

Las fracciones solubles procedentes de muestras humanas *post mortem* clasificadas como Braak II (sin deterioro cognitivo) y Braak V-VI (pacientes de Alzheimer, con demencia) fueron analizadas *in vitro* para determinar su capacidad de agregación de A β . Este procedimiento fue realizado en el laboratorio del Dr. Rodrigo Morales (Universidad de Texas, Health Science Center, Houston, Estados Unidos).

Producción y purificación de A β_{40}

Para la producción de A β_{40} , se cultivaron células *E. coli* que contenían el plásmido pET28 GroES-Ub-A β_{40} . El cultivo se realizó a 37°C en medio Luria (LB, *Luria broth*) suplementado con kanamicina (50 μ g/ml). La expresión de A β_{40} fue inducida con 0,4 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Tras 6 horas, las células fueron recogidas y lisadas empleando tampón de lisis (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% tritón X-100, 1mM ditioneitol (DTT) and 0,1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)). Tras 30 minutos de incubación en hielo, se añadió lisozima (1 mg/ml) al precipitado resuspendido y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, el precipitado resuspendido fue sonificado y centrifugado a 15000 x g durante 30 minutos. Estos pasos de resuspender el precipitado en tampón de lisis, sonificar y centrifugar, se realizaron dos veces. A continuación, se realizaron 4 pasos de lavado: 3 pasos con tampón de lavado I (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% tritón X-100 y 1mM DTT) y un paso con tampón de lavado II (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA y 1mM DTT). Los cuerpos de inclusión se obtuvieron centrifugando a 15000 x g durante 30 minutos y se resuspendieron en un tampón específico de solubilización (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT y 8 M urea). Para eliminar las proteínas insolubles, se centrifugó a 30000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante, que contenía la proteína de fusión GroES-Ub-A β_{40} , fue recogido y purificado a través de una columna Ni-NTA. Para escindir el A β_{40} , las proteínas de fusión fueron diluidas 3 veces en tampón de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 3 M urea) y digeridas con enzima deubiquitinante recombinante (Usp2cc), empleando un ratio molar 1:100 enzima-sustrato a 37°C durante 2 horas. Tras la digestión, las muestras fueron sonificadas y

centrifugadas a 30.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante fue cargado en una columna de fase inversa (o reversa) PRP-3 (21.5 mm x 250 mm, Hamilton Company, USA). El péptido A β ₄₀ fue purificado con un tampón disolvente I (10 mM amonio acetato pH 10, 2% acetonitrilo) y tampón disolvente II (70% acetonitrilo) con un flujo de 10 ml/min usando un gradiente lineal del 0-20% de tampón II durante 5 minutos, después un gradiente lineal del 20-40% durante 30 minutos y finalmente un gradiente del 40-100% durante otros 30 minutos. El A β ₄₀ fue liofilizado y guardado a -80°C hasta su uso.

Preparación de A β ₄₀ libre de agregados

El A β ₄₀ liofilizado se disolvió a una concentración de 1 mg/ml en 500 μ l de hidróxido de amonio (NH₄OH) al 0,1% en hielo. A continuación, se filtró a través de un filtro de 30 kDa (Amicon Ultra Centrifugal Filter Units, Millipore, Ref. UFC503096) a 14.000 x g durante 12 minutos, con el fin de eliminar los agregados de gran tamaño. La concentración de proteína filtrada se midió empleando el kit Micro BCA™ Protein Assay (Pierce, Ref.23235) y se guardó a -80°C hasta su uso.

Ensayo de agregación *in vitro*

Las fracciones solubles de individuos Braak II y de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) fueron analizadas para comprobar su potencial de agregación *in vitro* mediante un ensayo de agregación proteica similar al descrito por [Salvadores et al. \(2014\)](#). En resumen, el A β ₄₀ (2 μ M), purificado y libre de agregados, fue incubado en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7.4) y con 5 μ M de Tioflavina-T (ThT), a 20°C en una placa opaca de 96 pocillos, empleando ciclos de un minuto de agitación (500 rpm) cada 30 minutos. Las fracciones solubles fueron diluidas (10⁻⁴) en PBS (HyClone™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, sin calcio ni magnesio, GE Healthcare Life Sciences, USA) y se añadieron a los pocillos que contenían A β ₄₀, resultando en una dilución final de las fracciones solubles de 10⁻⁵. La agregación fue monitorizada midiendo la fluorescencia de la Tioflavina-T a 485 nm tras la excitación a 435 nm, usando un espectrofluorómetro de placas (SpectraMax® iD3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, USA), y se ajustó empleando la ecuación de Boltzmann. Las curvas fueron comparadas empleando el test de Tukey de comparaciones múltiples. Todos los cálculos se realizaron mediante el software Prism 5 (GraphPad).

2.11. ESTUDIOS *IN VIVO*

2.11.1. INYECCIONES ESTEREOTÁXICAS INTRACEREBRALES

Con el objetivo de comprobar *in vivo* la capacidad de agregación, propagación y toxicidad del A β soluble que se acumula en el cerebro en la EA, se realizaron inyecciones intracerebrales de las fracciones solubles aisladas del cerebro de pacientes en estadio Braak V-VI y de animales APP/PS1 de 18 meses. Además, como control negativo, se realizaron inyecciones con PBS.

Los animales APP y WT se dividieron en 4 grupos cada uno (APP: A-D, WT: E-H) (**figura 2.18**). Los grupos A-D estaban formados por animales APP inyectados con las fracciones solubles de pacientes Braak V-VI (A), con las fracciones solubles de ratones APP/PS1 de 18 meses (B), con PBS (C) y animales no inyectados (D). Los grupos E-H correspondían a los animales WT inyectados con las fracciones solubles de pacientes Braak V-VI (E), con las fracciones solubles de ratones APP/PS1 de 18 meses (F), con PBS (G) y animales no inyectados (H). Cada grupo experimental estaba formado por 11-16 animales (**ver tabla 2.2**). Estos animales fueron inyectados a los 4 meses de edad y sacrificados a los 8 meses. Las pruebas conductuales se realizaron a los 7 meses de edad (**ver apartado 2.11.2**).

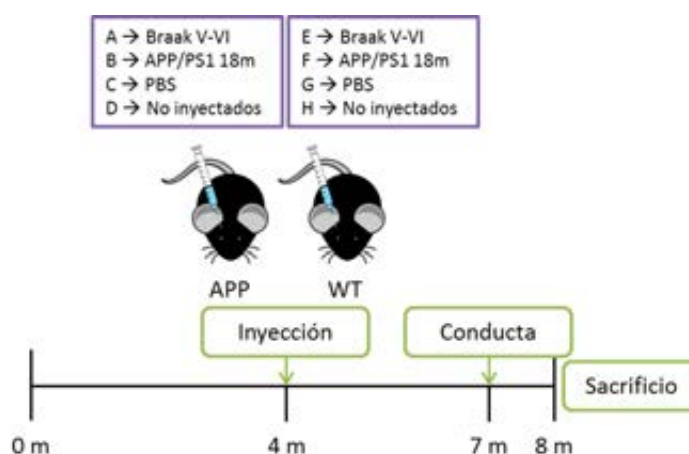


Figura 2.18. Diseño experimental empleado para estudiar la capacidad tóxica de las fracciones solubles de pacientes y ratones APP/PS1 en el modelo amiloidogénico APP y en animales WT. Los animales fueron operados a los 4 meses. A los 7 meses se realizó el estudio conductual y a los 8 meses fueron sacrificados.

Durante una estancia predoctoral en la universidad de California Irvine, se analizaron animales previamente operados mediante inyecciones estereotáxicas. Los animales 3xTgAD y hA β -KI fueron inyectados a los 7-8 meses y se dividieron en 4 grupos cada uno (**figura 2.19**). Los grupos A-B estaban formados por animales 3xTgAD inyectados con las fracciones solubles de pacientes Braak VI y con PBS, respectivamente; estos animales fueron sacrificados a los 5 meses después de ser operados, cuando tenían 12-13 meses. Los grupos C-D estaban formados por animales hA β -KI inyectados con las fracciones solubles de pacientes Braak VI y con PBS, respectivamente; estos animales fueron sacrificados a los 5 meses después de ser operados, a una edad de 12-13 meses. Los grupos E-F correspondían a los animales 3xTgAD inyectados con las fracciones solubles de pacientes Braak VI y con PBS, respectivamente; estos animales fueron sacrificados a los 10 meses después de la operación, cuando tenían 17-18 meses. Los grupos G-H correspondían a los animales hA β -KI inyectados con las fracciones solubles de pacientes Braak VI y con PBS, respectivamente; estos animales fueron sacrificados a los 10 meses después de la inyección, a la edad de 17-18 meses. Cada grupo experimental estaba formado por 5-7 animales (**ver tabla 2.3**).

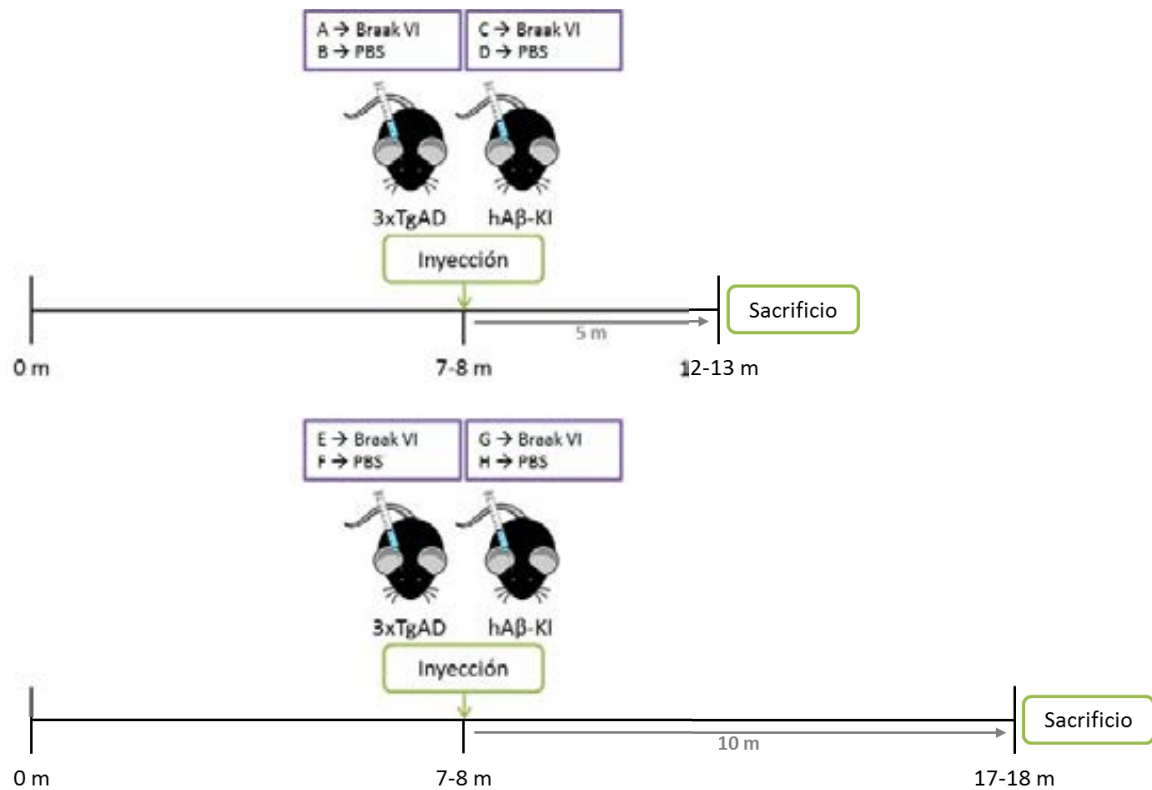


Figura 2.19. Diseño experimental empleado para estudiar la capacidad tóxica de las fracciones solubles de pacientes en los modelos 3xTgAD y hAβ-KI. Los animales fueron operados a los 7-8 meses de edad. Por un lado, se dejó envejecer a los animales 5 meses (grupos A-D) y por otro 10 meses (grupos E-H).

Para el procedimiento quirúrgico, los ratones operados fueron anestesiados por inhalación empleando sevoflurano. Como analgésico se empleó buprenorfina (0'3mg/ml), que se inyectó intraperitonealmente (dosis 0'1mg/kg) tanto antes como justo después de la operación. La inducción de la anestesia se llevó a cabo en una cámara con un flujo constante de sevoflurano (5% sevoflurano, 1 l/min O₂). Una vez profundamente dormido, la cabeza del animal se fijó en el aparato estereotáxico (Modelo 940, Kopf) mediante una mascarilla con un flujo constante de sevoflurano (2'5% sevoflurano, 0'4 l/min O₂) para el mantenimiento de la anestesia y unas varillas en los conductos auditivos del animal. Durante la operación y la recuperación del animal, se empleó una almohadilla térmica como fuente de calor para evitar la hipotermia. Para mantener los ojos del animal hidratados durante la operación, se usó un gel ocular. Tras la inmovilización de la cabeza del animal, se localizaron los puntos Bregma y Lambda en el cráneo. Tomando como coordenada cero el punto Bregma, se colocó la punta de la aguja de la jeringa Hamilton (Modelo 1801 RN SYR, Hamilton Robotics) en las coordenadas medio-lateral (ML) y antero-posterior (AP) de inyección. A continuación, en dicho punto se realizó un pequeño orificio en el cráneo mediante un taladro quirúrgico (Ideal Micro-Drill, Harvard Apparatus). Después, se procedió a bajar la aguja penetrando en el cerebro lentamente hasta las coordenadas dorso-ventrales (DV) de inyección. Las coordenadas de inyección fueron AP -1'8, ML -1'8, DV -1'8 (hipocampo derecho) (**figura 2.20**). En los animales APP y WT operados en la Universidad de Málaga, se inyectó un volumen de 2μl de fracción soluble (2μg/μl) o suero en el hipocampo derecho de los ratones. En los animales 3xTgAD y hAβ-KI operados en la Universidad de California Irvine, se inyectaron 2'5μl de fracción soluble

o suero en el hipocampo derecho. Tras extraer la aguja, se cerró la herida empleando un pegamento veterinario. Finalmente, se trató la zona de la herida con una pomada cicatrizante y una antibiótica, y se inyectó intraperitonealmente enrofloxacina (25mg/ml) a una dosis de 5mg/kg. Tras la operación los ratones se mantuvieron en jaulas individuales, y durante los 5 días posteriores fueron tratados por vía oral mediante el agua de bebida con paracetamol (100mg/ml) a una dosis de 1mg/ml y enrofloxacina a una dosis de 0'05mg/ml. Los animales fueron supervisados durante los días posteriores a la cirugía para comprobar el estado del animal y de la herida.

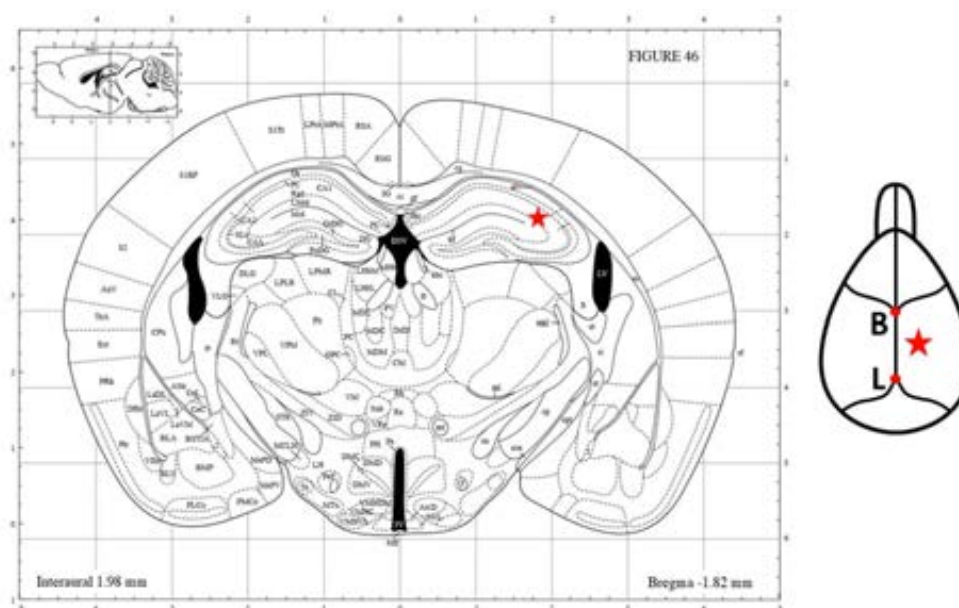


Figura 2.20. Sitio de inyección estereotáxica en el hipocampo derecho de ratón. A la izquierda se muestra una imagen de atlas del nivel rostro-caudal en el cual se realizó la inyección. A la derecha, un esquema del cráneo de ratón con los puntos Bregma (B) y Lambda (L). El lugar de inyección aparece indicado mediante una estrella roja. Modificado de Franklin and Paxinos 2008.

2.11.2. PRUEBAS CONDUCTUALES

Los animales APP y WT inyectados mediante estereotaxia en la Universidad de Málaga (**apartado 2.11.1**), así como los correspondientes controles no inyectados, se sometieron a una serie de pruebas conductuales para así evaluar el efecto de las inyecciones *in vivo*. Para estos estudios se empleó un total de 111 animales de diferentes grupos y genotipos (n=11-16/grupo), tanto machos como hembras, siendo todos de la misma edad (7 meses) (**ver tabla 2.2**). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con comida y bebida *ad libitum* y con unas condiciones de temperatura, ciclo de luz/oscuridad y humedad constantes.

Todas las pruebas conductuales se realizaron en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga: test de anidación (*nesting test*), prueba de campo abierto, test de reconocimiento de objetos (posición y nuevo objeto), laberinto en Y y laberinto en Y de contexto. Las pruebas conductuales se realizaron en la misma sala, durante el periodo de luz del ciclo luz/oscuridad, en condiciones de temperatura y luz constantes. En todos los casos, se realizó una habituación previa, llevando las jaulas de los animales a la sala de conducta una hora antes del inicio de cada prueba. De las pruebas realizadas, solo se han incluido en este

trabajo los resultados de la prueba de campo abierto, cuyo protocolo se detalla a continuación.

La prueba de campo abierto (*open field*) permite detectar problemas en la locomoción como consecuencia de las inyecciones, así como estimar el nivel de estrés de los animales. Esta prueba se realizó en un recipiente cuadrado con cuatro cuadrantes o arenas (40 cm x 40 cm cada cuadrante). Se midió la intensidad de luz en cada cuadrante asegurándonos de que ésta fuera igual en todos ellos. Tras la habituación a la sala, los ratones se sacaron de sus jaulas y se pusieron en la arena (un ratón en cada arena), soltando con cuidado a cada ratón en el centro de ésta. La prueba duró 5 minutos, durante los cuales cada animal exploró libremente la arena. Tras esto, los animales fueron devueltos a sus respectivas jaulas. Entre cada tanda de ratones, el recipiente del *open field* se limpió con etanol 70° para eliminar olores. Toda la prueba fue grabada para su posterior análisis mediante el programa Ethovision XT 7 (Noldus, Países Bajos). Este programa nos permitió cuantificar la distancia recorrida y la velocidad (actividad locomotora espontánea), así como el tiempo transcurrido en la zona interna y externa de la arena (estrés) (figura 2.21).

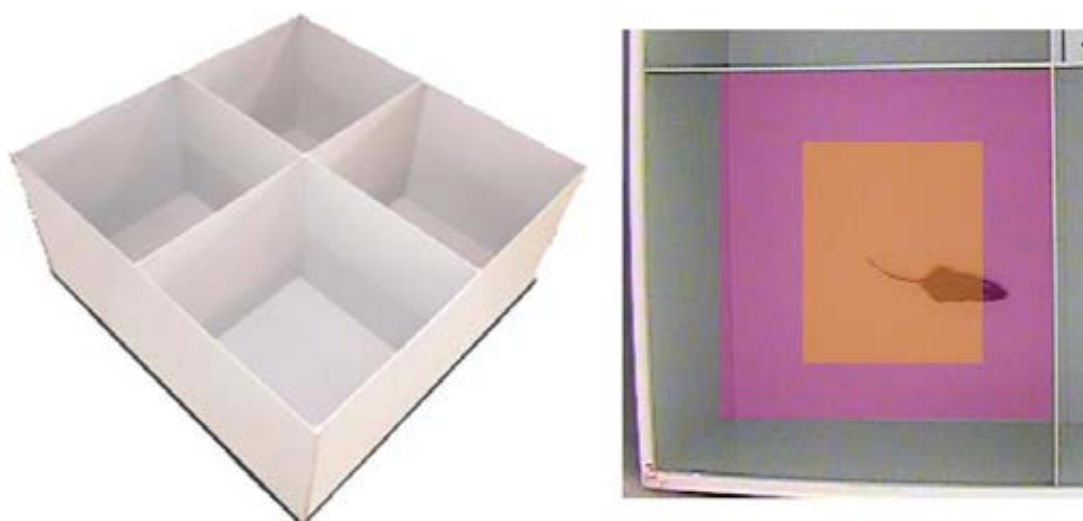


Figura 2.21. Prueba de campo abierto para la evaluación de la locomoción y el estrés. A la izquierda se muestra el recipiente empleado para la prueba de campo abierto, con cuatro cuadrantes o arenas. A la derecha se muestra la arena dividida en zona interna (naranja) y zona externa (rosa).

2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En este trabajo, los datos se han representado en gráficos de barras con la media del grupo \pm la desviación estándar (SD), o bien en gráficos de cajas y bigotes con los percentiles 25, 50 y 75, según si los datos cumplían los criterios de normalidad e igualdad de varianzas (muestras paramétricas) o no (muestras no paramétricas). El análisis estadístico de los datos, así como la representación en gráficas, se realizó empleando el software estadístico Prism 7.0 (GraphPad). Para determinar si existían diferencias significativas entre dos muestras independientes, se empleó la prueba *t de student* (muestras paramétricas) o la prueba *U de*

Mann Whitney (muestras no paramétricas). Para determinar si existían diferencias entre más de dos muestras independientes, se empleó el análisis de varianza (ADEVA) de una vía (muestras paramétricas) o la prueba de *Kruskal-Wallis* (muestras no paramétricas), seguido de pruebas post hoc para determinar qué grupos eran significativamente diferentes. Como pruebas post hoc de comparaciones múltiples se emplearon la prueba de *Tukey* o la *t* de student (muestras paramétricas) o bien la prueba de *Dunn* (muestras no paramétricas). Para los análisis de correlación entre variables se empleó el coeficiente de *Pearson* (muestras paramétricas) o de *Spearman* (muestras no paramétricas). El nivel de significación en las pruebas estadísticas fue de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)

2.13. APÉNDICE

2.13.1. TAMPONES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

- Tampón fosfato (PB) 0,4 M, pH 7,4

Dihidrogenofosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13,6 g
Hidrogenofosfato disódico ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	53,4 g
H_2O destilada	hasta 1000 ml

Disolver y ajustar el pH a 7,4

- Tampón fosfato salino (PBS) 0.1M pH 7,4

Cloruro sódico (NaCl)	9 g
PB 0,4M pH 7,4	250 ml
H_2O destilada	hasta 1000 ml

- Tampón fosfato salino (PBS) con azida

PBS	60 ml
Azida sódica	120 μl al 10%

- Tampón fosfato salino (PBS) con Tritón

PBS	200 ml
Tritón X-100	400 μl al 0,2%

- Tampón fosfato salino (PBS) con Tritón y azida

PBS-Tritón	100 ml
Azida sódica	1 ml al 10%

- Tampón citrato sódico 50 mM ph 6

Citrato sódico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	1,47 g
H ₂ O destilada	hasta 100 ml

Disolver y ajustar el pH a 6,0

2.13.2. TAMPONES PARA WESTERN BLOT Y DOT BLOT

- Tampón TBS

Tris 2 M	50 ml
NaCl 5M	20 ml
H ₂ O destilada	enrasar hasta 4 litros

- Tampón TBS-T

TBS	100 ml
Tween 20	0,1 ml

2.13.3. SOLUCIÓN FIJADORA (PLP)

- Paraformaldehído 4%, L-lisina 75 mM, Metaperyodato sódico 10 mM (PLP) en PB 0,1M, pH 7,4

Paraformaldehído (CH_2O) _n	4 g
L-Lisina monoclóridato ($C_6H_{15}ClN_2O_2$)	1,37 g
Metaperyodato sódico (IO_4^-)	0,21g
PB 0,2M, pH 7,4	50 ml
H ₂ O destilada	

1. Disolver 4 g de paraformaldehído en 25 ml de agua destilada, calentada previamente a 60°C, y añadir unas gotas de NaOH para su completa dilución.
2. Filtrar y enrasar con agua destilada hasta 50 ml y dejar enfriar unos minutos.
3. Disolver 1,37 g de L-lisina y 0,21 g de metaperyodato sódico en 50 ml de PB 0,2M, pH 7,4 y añadirlo a la disolución anterior.

Se emplearán 180 ml de fijador para cada animal en la perfusión y 20 ml del mismo para la postfijación.

2.13.4. SOLUCIÓN CRIOPROTECTORA

- Sacarosa al 30% con azida sódica al 0,02%

Sacarosa $C_{12}H_{22}O_{11}$	30 g
Azida sódica	20 µl
PBS 0,1M pH 7,4	100 ml

2.13.5. PORTAOBJETOS GELATINIZADOS

- Solución de gelatina

Gelatina oro	1g
Alumbre de cromo ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
H ₂ O destilada	200 ml

Gelatinizado de los portaobjetos

1. Desengrasar los portaobjetos en una solución de alcohol absoluto y éter (proporción 1:1) durante al menos un día.
2. Secar los portaobjetos.
3. Calentar agua destilada a 60°C para disolver la gelatina y, añadir el alumbre de cromo hasta que se disuelva.
4. Sumergir los portaobjetos en la solución de gelatina durante 15 segundos, dejar secar y volver a sumergirlos sucesivamente durante 15 segundos en agitación.
5. Secar los portaobjetos en una estufa a 37°C durante 24 horas.

Los portaobjetos gelatinizados mediante este procedimiento son viables durante al menos dos meses desde el momento de su preparación.

2.13.6. SOLUCIÓN DE REVELADO

- Solución de 3-3'-diaminobencidina (DAB) tetrahidro-clorhídrico 0,02%

- Tampón Tris-Clorhídrico 0,1M, pH 7,4:

Tris 50 mM	0,06 g
Agua destilada	50 ml
Ajustar pH con ácido clorhídrico	

- Añadir y disolver DAB 0,3 g
- Filtrar y almacenar la solución (DAB-Tris) en alícuotas de 500 µl a 20°C

- Solución de revelado DAB 0,02%-Níquel 0,03%

- Níquel sulfato amónico 0,012 g
- PBS 0,1 M pH 7,4 15 ml
- DAB-Tris 500 µl

Para preparar esta solución de revelado, se debe diluir el níquel en el tampón PBS, y a continuación añadir una alícuota (500 µl) de DAB-Tris ya descongelada. Por último, filtrar y añadir el peróxido de hidrógeno (0,03% en la solución final).

En el caso de revelar con DAB sin níquel, se realiza todo el procedimiento igual omitiendo el paso de añadir níquel.

2.13.7. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE

PBS 0.1M pH 7,4	10 min
H ₂ O destilada	15 min
Etanol 50°	10 min
Etanol 70°	10 min
Etanol 96°	10 min
Etanol 100°	10 min
Disolvente natural (xileno)	15 min
Montaje con DPX	

2.13.8. MEDIO DE MONTAJE PARA FLUORESCENCIA

- 1,4-diazabicyclo [2.2.2.] octano (DABCO)
 - Añadir PBS 0,1M pH 7,4 y glicerol a partes iguales (proporción 1:1)
 - Diluir DABCO al 3% en la solución preparada
 - Mantener la solución a 4°C y en oscuridad

2.13.9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

- Agarosa al 3% en H₂O destilada

Agarosa	3 g
H ₂ O destilada	100 ml

1. Añadir la agarosa al agua destilada previamente calentada y agitar de manera constante hasta conseguir su solubilización.
2. Verter la agarosa en el molde y dejar enfriar unos segundos antes de introducir el tejido fijado a encastrar.

- Tetróxido de osmio 1% en PB 0,1M pH 7,4

Tetróxido de osmio al 4%
PB 0,1M

Mezclar ambos compuestos en una proporción 1:3, respectivamente.

- Resina para la inclusión del tejido (Araldita)

Araldita	10,8 g
DDSA	9,2 g
DMP-30	0,4 g

Para la preparación de la resina, que debe realizarse en el momento de su uso, se añade primero la araldita y seguidamente el DDSA, y se mezclan bien ambos con una varilla de vidrio hasta que queden perfectamente mezclados y sin burbujas. Por último, se añade el acelerador DMP-30 y se mezcla igual que los compuestos anteriores.

- Contrastado en bloque del tejido

Acetona al 70 %

Uranilo al 1%

Ambos compuestos se mezclan por agitación, en la cantidad que se necesite e inmediatamente antes de su uso. Este proceso debe realizarse con material de plástico desechable y en el servicio de radioisótopos de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

- Solución de crioprotección para inmuno-oro

H ₂ O destilada	77,5 ml
Azida sódica al 10%	200 µl
Glicerol	10 ml
PB 0,1M	12,5 ml
Sacarosa	25 g

- Solución de bloqueo 1 (diluyente de los anticuerpos)

Azida sódica al 10%	1 ml
BSA (Albúmina de suero bovino)	2 g
PBS 0,1 M	100 ml

- Solución de bloqueo 2

BSA al 0,8%
 Gelatina de pescado al 0,1%
 PBS 0,1M

2.13.10. TINCIONES HISTOLÓGICAS

- Tioflavina-S al 0,02%

Tioflavina-S	0,02 g
Etanol 50°	100 ml

- Rojo Congo

Rojo Congo (C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂)	2 ml
NaCl al 0,03% p/v	0,3 ml
Etanol 100°	8 ml
Filtrar siempre antes de usar	

- DAPI

DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico)	10 µl
H ₂ O destilada	2,5 ml

- Azul de toluidina

Azul de toluidina	0,5 g
Tetraborato sódico decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
H ₂ O destilada	100 ml

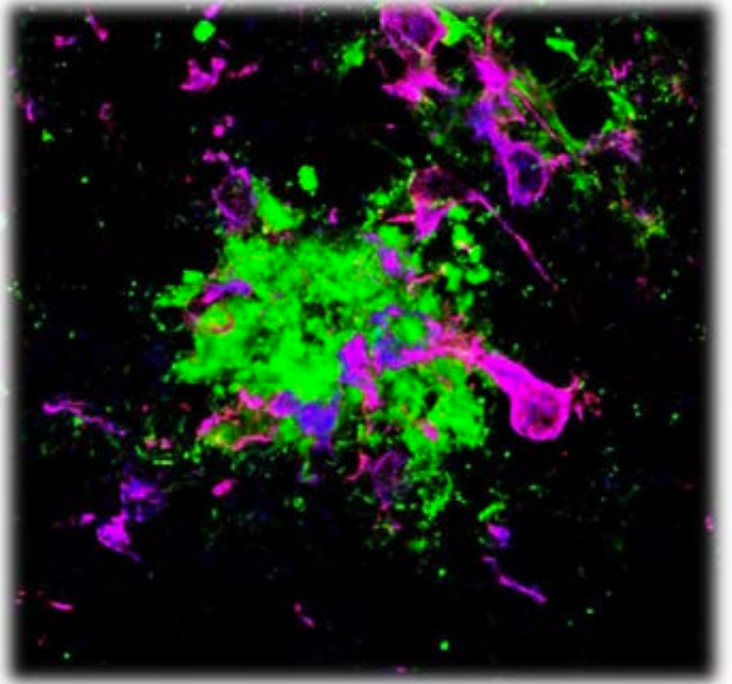
En primer lugar, disolver, por un lado, el colorante azul de toluidina en 50 ml de agua destilada y, por otro, el tetraborato sódico en 50 ml de agua destilada. A continuación, mezclar ambas disoluciones a partes iguales y filtrar.

2.13.11. LISTADO DE REACTIVOS

Acetato de uranilo al 1% (Idistec, Ref. #22400)
 Acetona (Panreac, Ref. 141007.1211)
 Ácido fórmico al 85% (Panreac, Ref. 141029.1611)
 Agarosa al 3% (Gellyphor, Ref. EMR010100)
 Alumbre de cromo (Panreac, Ref. 141284)
 Araldita 502 kit (Electron Microscopic Sciences, Ref. 13900)
 Azida sódica (Panreac, Ref. 122712.1608)
 Azul de Coomassie G-250, Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Ref. 500-0006)
 Azul de toluidina (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 429282)
 BSA 0,2 mg/ml (Bio-Rad, Ref. 700-100P)
 BSA *Heat Shock Fraction* (Sigma-Aldrich, Ref. A7906-100G)
 Buprenorfina 0'3 mg/ml (Divasa-Farmavic)
 Citrato sódico (Panreac, Ref. 131655)
 Cloruro de oro (Sigma-Aldrich, Ref. HT1004-100ML)
 Cloruro potásico (Panreac, Ref. 131494)
 Cloruro sódico (NaCl) (Panreac, Ref. 131659)
 DAB, 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorhídrico (Sigma-Aldrich, Ref. D5637)
 DABCO (Sigma-Aldrich, Ref. D-2522)
 DDSA (Dodecenyl succinic anhydride) (Idistec, Ref. #13700)
 DMP-30 (Tri D-Metilaminoetilfenol) (Electron Microscopy Science, Ref. 13600)
 DNaseI (Roche)
 DPX medio de montaje (Sigma-Aldrich, Ref. 06522)
 EDTA (Applichem)
 Enrofloxacin, Alsir 25 mg/ml (Esteve)
 Etanol absoluto deshidratado (Merck, Ref. 1.00983.1000)
 ExtrAvidin® (Sigma Aldrich, Ref E-2886)
 Filtro de nylon diámetro 100 µm (Fisher Scientific)
 Fluoruro sódico (NaF) (Sigma-Aldrich, Ref. S7920)
 Gelatina de pescado (Sigma-Aldrich, Ref. G7041-100G)
 Gelatina oro (Panreac, Ref. 251336)

Geles de tricina al 16% (Invitrogen, Ref. EC66952BOX)
Glicina (Applichem, Ref. A1377)
Glutaraldehído 25% (Electron Microscopy Science, Ref. 16210)
Hidróxido sódico NaOH (Acros Organics, Ref. 206060025)
Inhibidores de fosfatasas (ThermoFisher Scientific, Ref. 78420).
Inhibidores de proteasas (Roche, Ref. 4693116001)
Kit bloqueo Avidina/Biotina (Vector Labs, Ref. SP-2001)
Kit de eliminación de autofluorescencia (Millipore, Ref. 2160)
Kit HQ SILVER™ (Nanoprobes, Ref. 2012)
L-Lisina monoclórhidrato (Merck, Ref. 1.05700)
Lubrithal gel ocular (Dechra)
Membranas de nitrocelulosa *dot blot*, 0,2 µm, 8cm x 8cm (ThermoFisher, Ref. 88024)
Membranas de nitrocelulosa *western blot*, iBlot 2 Transfer Stacks (Invitrogen, Ref. IB23001)
MES tampón 20x (Bioland Scientific, Ref. MES01-03)
Metanol (Panreac, Ref. 141091.1211)
Níquel sulfato amónico (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 464545)
NuPAGE LDS Sample Buffer (ThermoFisher, Ref. NP0007)
NuPAGE Sample Reducing Agent (ThermoFisher, Ref. NP0009)
Omnimatrix pomada cicatrizante (HiFarmaX)
Ortovanadato sódico Na₃VO₄ (Sigma, Ref. 450243)
Otomax pomada antibiótica (MSD Animal Health)
Paracetamol, Apiretal 100 mg/ml (Laboratorios ERN)
Paraformaldehído (Merck, Ref. 1.04005)
PBS (Sigma, Ref. P4417)
Pentobarbital sódico 20% (Dolethal®, Vetequinol S.A.)
Percoll (Sigma)
Peróxido de hidrógeno 30% (Panreac, Ref. 107210.0250)
PIPES (Sigma)
Premium Clear Blue X-ray Film (Bioland Research, Ref. A03-02)
Rojo congo (Sigma-Aldrich, Ref. C6277)
Sevoflurano (Vademecum)
SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (ThermoFisher, Ref. 34078)
Tetróxido de osmio 1% (Electron Microscopic Sciences, Ref. 19150)
Tioflavina-S (Sigma-Aldrich, Ref. T1892)
Tiosulfato sódico (Panreac, Ref. 141721)
Tris-clorhídrico (Tris-HCl) (Panreac, Ref. A3981)
Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Ref. T9284)
Tween 20 (Fisher Scientific, Ref. BP337-500)
Vetbond pegamento veterinario (3M)
Xileno (Panreac, Ref. 141769.2711)

3. Resultados



La finalidad principal de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido caracterizar, desde una perspectiva principalmente celular y subcelular, la relación entre la patología amiloide y la microglía activada en el hipocampo de un modelo transgénico amiloidogénico APP/PS1 para la enfermedad de Alzheimer. El conocimiento y control de la respuesta microglial, y de los posibles subtipos funcionales de la microglía activada podría aportar nuevas oportunidades terapéuticas para modificar el curso de la enfermedad. El principal modelo utilizado en este trabajo ha sido el doble transgénico APP_{751SL}/PS1_{M146L}, ampliamente caracterizado por nuestro grupo de investigación desde el año 2003 en colaboración con la empresa farmacéutica Sanofi (Francia), donde fue generado dicho modelo. Durante estos 17 años, y en el marco de diferentes proyectos de investigación subvencionados por el Instituto de Salud Carlos III, el Centro de Investigaciones Biomédicas en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), la Junta de Andalucía, y la Fundació La Marató, nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica de la Universidad de Sevilla, ha estudiado los procesos neurodegenerativos, incluyendo muerte neuronal y pérdida sináptica, así como el proceso neuroinflamatorio y la respuesta glial en diversas regiones cerebrales de este modelo transgénico. Esta Tesis Doctoral ha contribuido en el avance de la caracterización de este modelo mediante la identificación de subtipos funcionales de la microglía y su relación con la progresión de la patología amiloide, así como de la capacidad de propagación *in vivo* del A β soluble derivado de cerebro de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) y del modelo amiloidogénico APP/PS1. El bloque de Resultados se ha dividido en tres capítulos; el primero (3.1), recoge los resultados relacionados con la caracterización de la patología amiloide en el modelo APP/PS1 de los 4 a los 18 meses de edad, parte de este estudio ha sido publicado en un capítulo de libro (ver apartado publicaciones); el segundo (3.2), engloba los resultados sobre la caracterización de la microglía activada que rodea las placas y su relación con el avance de la patología en el modelo APP/PS1, estos resultados están siendo preparados para publicación; y por último, el tercero (3.3), incluye los resultados del estudio de la propagación *in vivo* del A β soluble en modelos animales de la formas familiares (APP y 3xTgAD) y esporádica (hA β KI) de la enfermedad de Alzheimer, parte de estos resultados están incluidos en un artículo actualmente en 2ª revisión en la revista Nature Communications.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral he colaborado activamente con el grupo de investigación en trabajos que han sido el eje primordial para plantear el estudio que aquí se presenta. A continuación, se describen los principales hallazgos de estos estudios y se indican las referencias donde se han publicado.

1. Hemos demostrado que en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) la respuesta microglial es atenuada en comparación con la intensa activación microglial que exhiben los modelos amiloidogénicos y que, además, existe un proceso degenerativo de la microglía con un gradiente regional (giro dentado>CA3>CA1>giro parahipocampal). La degeneración microglial se caracteriza por una disminución significativa del dominio microglial (área ocupada y vigilada por estas células gliales) y por la presencia de rasgos morfológicos patológicos (atrofia, fragmentación de prolongaciones y formación de distrofias). Las formas fosforiladas de Tau, y no el A β , presentes en las fracciones solubles S1 de hipocampo de pacientes de Alzheimer son tóxicas para la microglía. Teniendo en cuenta que las células microgliales están

- implicadas en múltiples funciones beneficiosas, como la fagocitosis de A β , la compactación de las placas y la limitación de la toxicidad de A β , una respuesta microglial deficiente podría de hecho agravar la progresión de la patología de la EA. Este trabajo ha sido fundamental para plantear la hipótesis de esta Tesis Doctoral. Publicado en *Sanchez-Mejias et al., 2016 Acta Neuropathologica 132(6):897-916, doi:10.1007/s00401-016-1630-5*
2. Hemos caracterizado la respuesta astrogliar a la patología amiloide en el modelo APP/PS1. Junto con la activación microglial tiene lugar una fuerte reactividad astrogliar en paralelo a la patología amiloide. Los astrocitos reactivos se sitúan cerca de las placas y sus prolongaciones se entremezclan con las de la microglía rodeando las fibras amiloides. Hemos identificado que los astrocitos reactivos intervienen en la fagocitosis de neuritas distróficas, la mayoría de naturaleza presináptica. Este proceso de fagocitosis parece ser poco eficiente, mostrando los astrocitos un fenotipo disfuncional. Pensamos que la actividad fagocítica de los astrocitos reactivos podría contribuir a eliminar las sinapsis disfuncionales o los desechos sinápticos, restaurando así los circuitos neuronales deteriorados y reduciendo el impacto inflamatorio y/o limitando la patología amiloide. Por lo tanto, la potenciación de las propiedades fagocíticas de los astrocitos reactivos puede representar una potencial terapia en la enfermedad de Alzheimer. Publicado en *Gomez-Arboledas et al., 2017 GLIA 66(3):637-653. doi: 10.1002/glia.23270*
 3. Una de las principales limitaciones de los modelos transgénicos de Alzheimer es la escasa o limitada muerte neuronal. Nuestro modelo APP/PS1 es de los pocos modelos que sí desarrollan pérdida de neuronas, lo cual aumenta su valor predictivo en estudios preclínicos. En este trabajo hemos descrito la vulnerabilidad diferencial de las principales poblaciones de interneuronas GABAérgicas (SOM y PV) en la corteza perirrinal del modelo APP/PS1 y en muestras humanas *post mortem* de pacientes de Alzheimer. Como componente clave de las redes cortico-hipocampales, la corteza perirrinal desempeña un papel importante en los procesos de memoria. Por lo tanto, la neurodegeneración de estas interneuronas podría contribuir a los ritmos cerebrales alterados y fallos cognitivos observados en las fases iniciales de la enfermedad. Publicado en *Sánchez-Mejias et al., 2019 Brain Pathology doi: 10.1111/bpa.12785*
 4. La mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer (EA) son de aparición tardía y ocurren esporádicamente. Sin embargo, la mayoría de los modelos animales existentes son de las formas familiares de la enfermedad de herencia autosómica dominante. Como un paso fundamental para modelar la EA de tipo esporádico (SAD), en este trabajo hemos generado ratones *knock-in* que expresan el A β humano bajo el control del locus *APP* del ratón. Este modelo acumula amiloide con la edad, desarrolla déficits cognitivos y de plasticidad sináptica. La inoculación de A β soluble humano acelera significativamente la patología amiloide en este modelo, con formación de placas difusas similares a las de los pacientes. Este nuevo modelo hA β -KI es una prometedora plataforma para investigar y probar factores de riesgo y terapias para la forma esporádica de la enfermedad. Trabajo en segunda revisión en la revista *Nature Communications*.

3.1. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS PLACAS AMILOIDES DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA

La presencia de depósitos extracelulares (placas) de beta-amiloide en el cerebro es una de las lesiones proteicas características de la enfermedad de Alzheimer, iniciándose su formación hasta 20 años antes de que comiencen los síntomas clínicos. Sin embargo, la relación entre la patología amiloide y la enfermedad de Alzheimer es un tema de considerable controversia, ya que existen individuos con una sustancial cantidad de placas en el cerebro y que no desarrollan síntomas. Se ha propuesto que las formas oligoméricas solubles de A β , en lugar de las placas en sí, podrían desempeñar un papel más importante en el daño sináptico y neuronal y en el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer. Se desconoce si en los individuos susceptibles a desarrollar deterioro cognitivo las placas sufren cambios en sus propiedades durante la progresión de la patología, volviéndose más tóxicas y liberando oligómeros solubles. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido analizar las posibles diferencias en las propiedades fenotípicas de las placas durante la progresión de la patología en un modelo transgénico amiloidogénico.

3.1.1. EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN EL MODELO APP/PS1

Como estudio inicial, se caracterizó la progresión de la patología amiloide extracelular en el hipocampo de ratones APP/PS1 desde los 4 a los 18 meses de edad, ya que dicha región es una de las primeras que se ven afectadas en este modelo amiloidogénico y clave en los procesos de memoria. Con el objetivo de estudiar y comparar la evolución de distintos tipos de placas amiloides, se emplearon dos marcadores: anti-A β ₄₂ y Tioflavina-S. Mediante inmunohistoquímica, el anticuerpo anti-A β ₄₂ marca la totalidad de las placas amiloides, tanto las fibrilares como las no fibrilares. Por otro lado, la Tioflavina-S es un fluorocromo que tiñe únicamente las placas amiloides de tipo fibrilar. En la **figura 3.1** se muestra el marcaje de las placas amiloides con anti-A β ₄₂ (**Fig. 3.1 A1-4**) y con Tioflavina-S (**Fig. 3.1 B1-4**) en ratones APP/PS1 de 4, 6, 12 y 18 meses de edad. Para ambos marcadores, se observó que la patología amiloide se agravaba de forma muy acusada con la edad en el hipocampo de este modelo transgénico. Los animales a los 4 meses de edad ya presentaban placas amiloides, pero estas eran escasas y se concentraban principalmente en la región del subículo, que tiene una patología muy temprana en el modelo. A edades avanzadas (12-18 meses), la patología amiloide estaba muy extendida por todo el hipocampo, observándose una gran concentración de placas amiloides en el subículo, en el hilio del giro dentado y en el estrato oriens de la región CA1 del hipocampo propro.

Tanto en nuestro modelo animal como en el cerebro de pacientes de Alzheimer, existen distintos tipos de placas (Fig. 3.2). Mediante inmunofluorescencia para A β oligomérico prefibrilar (OC positivo) combinada con tinción con Tioflavina-S, se pone de manifiesto la existencia de dos tipos de placas en el hipocampo de APP/PS1. Por un lado, se visualizaron placas fibrilares o filamentosas (Fig. 3.2 A1-A3), con forma estrellada y que presentaban con un core fibrilar TioS-positivo, que ocupa casi la totalidad de la placa, rodeado de un halo de oligómeros positivo para el anticuerpo OC. Estas placas eran las que se encontraban de forma mayoritaria en el hipocampo del modelo, siendo similares a las placas fibrilares que se forman en el giro dentado de pacientes con Alzheimer (Fig. 3.2 C1-C3). Por otro lado, en el modelo se observó un tipo minoritario de placas, las placas compactas o clásicas (Fig. 3.2 B1-B3), caracterizadas por su morfología redondeada y por presentar un core fibrilar denso y esférico TioS-positivo rodeado de un halo OC-positivo difuso de gran tamaño. Estas placas, se asemejan a las que se observan en la región CA de pacientes con EA (Fig. 3.2 D1-D3). Mediante una inmunofluorescencia doble con 4G8 (A β) y APP o AT8 (marcadores de distrofias) (Fig. 3.2 A4-E4), se pone de manifiesto que ambos tipos de placas, fibrilares y compactas, tanto en el modelo animal (Fig. 3.2 A4-B4) como en humano (Fig. 3.2 C4-D4), se caracterizan por ser neuríticas, es decir, presentan distrofias neuronales en la zona del halo. En las muestras humanas, se forman además placas de tipo difuso de gran tamaño y sin morfología definida, positivas para A β oligomérico, pero que no presentan un core fibrilar positivo para TioS (Fig. 3.2 E1-E3), y que no son neuríticas (Fig. 3.2 E4). Este tipo de placas difusas no neuríticas no se observan en el modelo APP/PS1.

Mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) convencional, se analizó la ultraestructura de las placas amiloides. En la figura 3.3 se muestran imágenes representativas de una placa de tamaño pequeño (Fig. 3.3 A) y otra de mayor tamaño (Fig. 3.3 B), ambas correspondientes a animales APP/PS1 de 12 meses. Ambos tipos de placa presentaban un núcleo (core) electrodenso con aspecto fibrilar del que irradian a nivel periférico haces de fibras (Fig. 3.3 A1 y B1). En esta región periférica de las placas se observó una estrecha relación entre el citoplasma de la microglía y las fibras amiloides, que se entrelazaban estrechamente entre sí (Fig. 3.3 B2). Las fibras amiloides presentan una mayor electrodensidad que el citoplasma microglial, lo cual hace más fácil identificar ambas estructuras en las imágenes de MET. Las placas pequeñas presentaban un core con una morfología redondeada, mientras que las placas de gran tamaño presentaban varios núcleos fibrilares y una morfología más estrellada. Las placas en este modelo transgénico APP/PS1, tanto las placas grandes como pequeñas, eran de tipo neurítico, es decir estaban rodeadas de neuritas distróficas (estructuras de origen axonal/presináptico anormalmente dilatadas por acumulación de vesículas autofágicas).

Para estudiar la evolución de la patología amiloide en el hipocampo del modelo APP/PS1, se llevó a cabo una cuantificación por análisis de imagen de la carga amiloide (área ocupada por las placas) en secciones inmunoteñidas con el anticuerpo anti-A β ₄₂ (placas fibrilares y no fibrilares) y otras teñidas con el fluorocromo Tioflavina-S (placas fibrilares) en animales de 4, 6, 12 y 18 meses de edad (n=3-4 animales/edad). Se realizó un análisis comparativo de dos regiones hipocámpales que se ven seriamente afectadas por la patología: CA1 y el subículo (Fig. 3.4). En general, en ambas regiones y con los dos marcadores

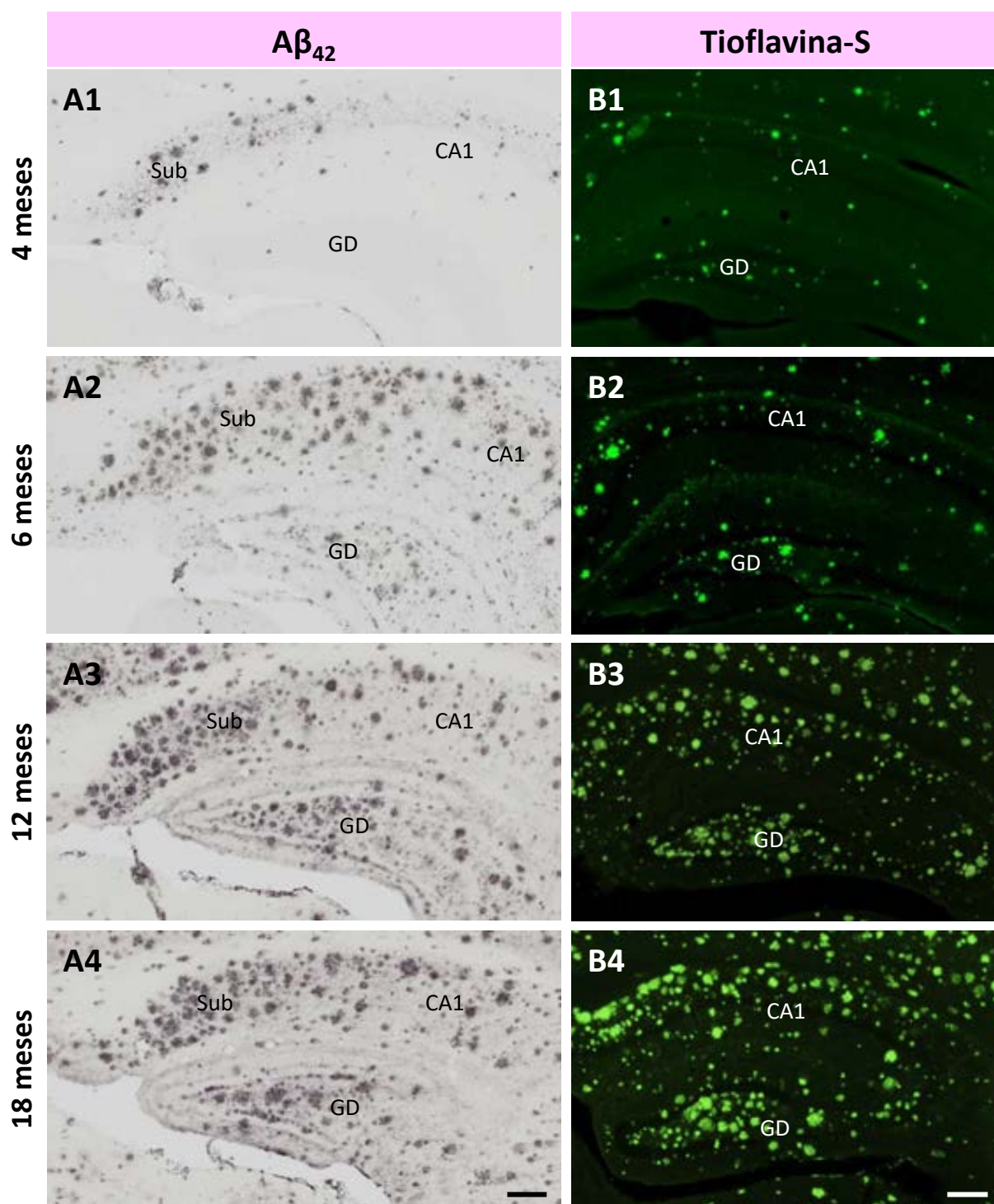


Figura 3.1. Progresión temporal de la patología amiloide en el hipocampo de ratones APP/PS1. Se ha utilizado marcaje inmunohistoquímico para $A\beta_{42}$ para visualizar todas las placas amiloides (**A1-A4**) y la tinción con Tioflavina-S para las placas fibrilares (**B1-B4**) en ratones de 4 (A1-B1), 6 (A2-B2), 12 (A3-B3) y 18 (A4-B4) meses de edad. A1-A4, microscopía de campo claro; B1-B4, microscopía de epifluorescencia. Sub: subículo, GD: giro dentado, CA1: región 1 del asta de Ammon. Barras de escala: 200 μ m.

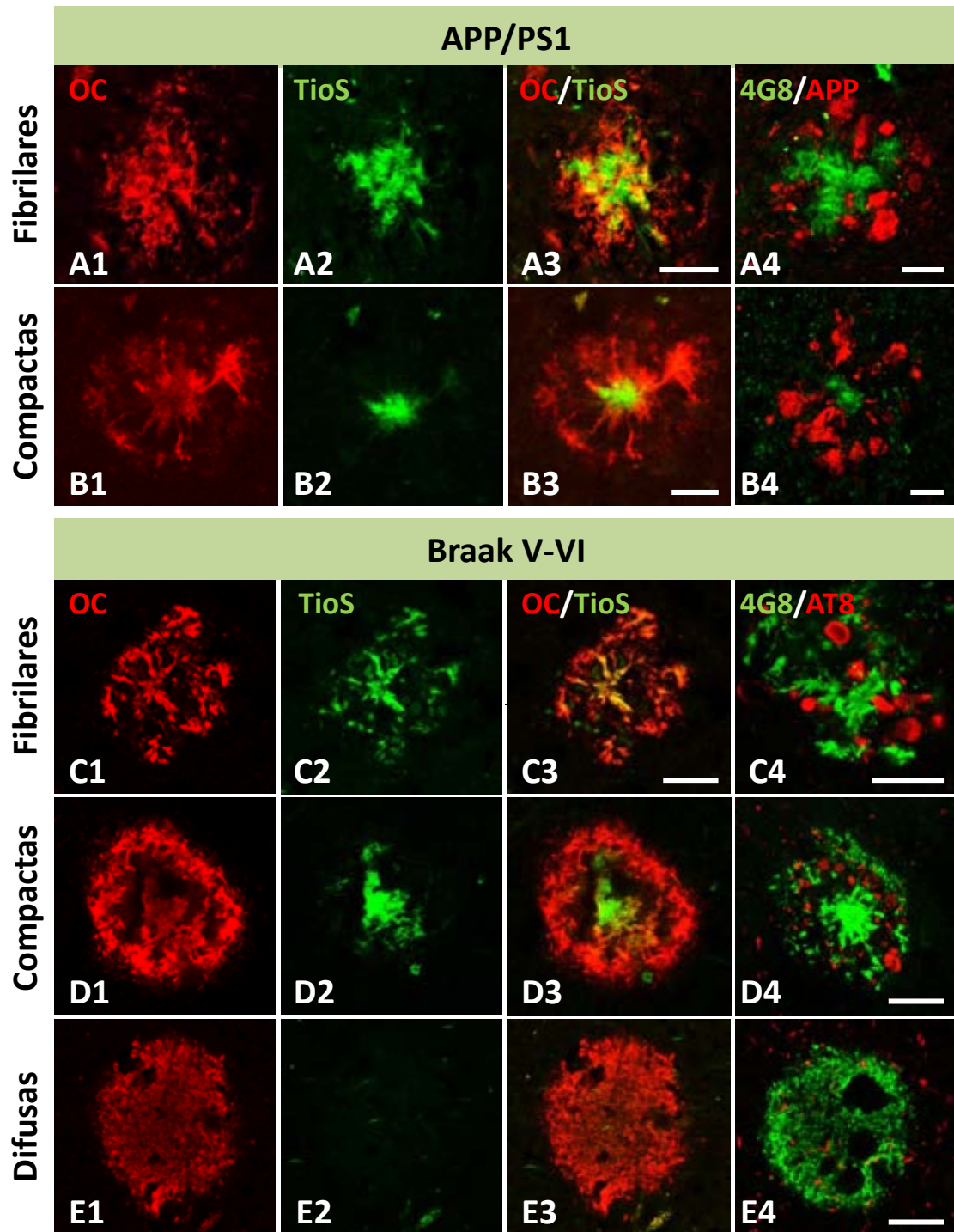


Figura 3.2. El hipocampo de ratones APP/PS1 desarrolla placas fibrilares y compactas similares a las del hipocampo de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI). Placas amiloides en hipocampo de APP/PS1 (A y B) y en hipocampo de paciente de Alzheimer (C-E) con marcaje fluorescente doble para A β oligomérico (anticuerpo OC en rojo; A1-E1) y A β fibrilar (Tioflavina-S en verde; A2-E2). En APP/PS1 se forman placas fibrilares (A1-A3) y compactas (B1-B3) similares a las de humano (C1-C3 y D1-D3). En el modelo APP/PS1 no se detectan placas difusas como las de humano (E1-E3). Las placas fibrilares y compactas son neuríticas en APP/PS1 (A4 y B4) y en pacientes de Alzheimer (C4-D4), visualizado mediante inmunofluorescencia doble para A β (anticuerpo 4G8; en verde; A4-E4) y para el marcador de neuritas distróficas APP (rojo; A4 y B4) o AT8 (rojo; C4-D4). Las placas difusas de Braak V-VI no son neuríticas (E4). Barras de escala: 20 μ m (A, C, D y E) y 10 μ m (B).

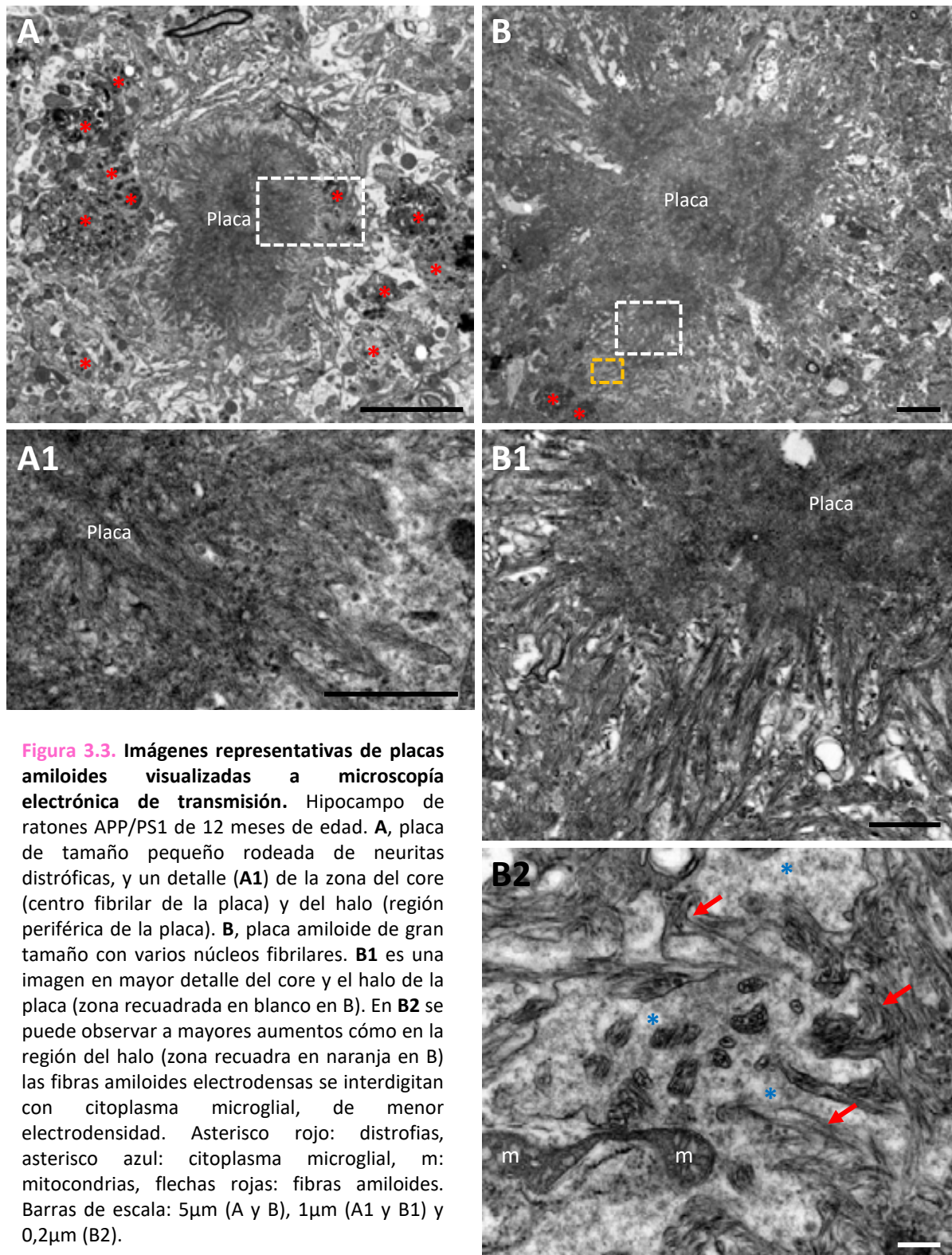


Figura 3.3. Imágenes representativas de placas amiloides visualizadas a microscopía electrónica de transmisión. Hipocampo de ratones APP/PS1 de 12 meses de edad. **A**, placa de tamaño pequeño rodeada de neuritas distróficas, y un detalle (**A1**) de la zona del core (centro fibrilar de la placa) y del halo (región periférica de la placa). **B**, placa amiloide de gran tamaño con varios núcleos fibrilares. **B1** es una imagen en mayor detalle del core y el halo de la placa (zona recuadrada en blanco en B). En **B2** se puede observar a mayores aumentos cómo en la región del halo (zona recuadrada en naranja en B) las fibras amiloides electrodensas se interdigitan con citoplasma microglial, de menor electrodensidad. Asterisco rojo: distrofias, asterisco azul: citoplasma microglial, m: mitocondrias, flechas rojas: fibras amiloides. Barras de escala: 5μm (A y B), 1μm (A1 y B1) y 0,2μm (B2).

empleados, se produjo un incremento significativo de la carga amiloide con la edad, estando el subículo más afectado que CA1 a todas las edades analizadas. En el caso de las placas inmunopositivas para $A\beta_{42}$, (**Fig. 3.4 A**) se detectó un incremento significativo de la carga amiloide con la edad en ambas regiones ($F(7,22)=41,84$, $P<0,0001$). Tanto en CA1 como en subículo, la carga amiloide a 18 meses era mucho mayor en comparación con 4 meses (CA1: $5,57\pm0,44$ veces, $p<0,01$; subículo: $3,16\pm0,45$ veces, $p<0,001$). Además, el subículo estaba más afectado que CA1, presentando una carga amiloide significativamente mayor (6 meses: $2,80\pm0,26$ veces; 12 meses: $2,39\pm0,38$ veces; 18 meses: $2,22\pm0,31$ veces, $p<0,001$). En cuanto a las placas de tipo fibrilar (**Fig. 3.4 B**), positivas para Tioflavina-S, se observó también un aumento de la carga amiloide con la edad en las dos regiones analizadas ($F(7,16)=48,14$, $P<0,0001$). A los 18 meses la carga amiloide era $9,58\pm0,49$ veces mayor que a 4 meses en CA1 ($p<0,01$). En el subículo ocurría un incremento similar, puesto que la carga amiloide aumentaba $9,13\pm1,48$ veces entre los 4 y los 18 meses ($p<0,001$). Para el marcador Tioflavina-S, la carga amiloide también alcanzó valores más altos en el subículo en comparación con CA1 (12 meses: $2,28\pm0,41$ veces, $p<0,01$; 18 meses: $2,65\pm0,43$ veces, $p<0,001$). En la **figura 3.5**, se muestra el estudio de la carga amiloide en cada región hipocámpal comparando conjuntamente los marcadores $A\beta_{42}$ y Tioflavina-S. Se observó que tanto en CA1 (**Fig. 3.5 A**) como en el subículo (**Fig. 3.5 B**), la carga amiloide era siempre mayor al emplear el marcador $A\beta_{42}$ (CA1: $F(7,19)=23,81$, $P<0,0001$; subículo: $F(7,19)=43,58$, $P<0,0001$). Las mayores diferencias entre ambos marcadores se observaron a los 6 meses de edad (CA1: $3,55\pm1,44$ veces, $p<0,01$; subículo: $4,02\pm0,38$ veces, $p<0,001$).

A continuación, se cuantificó en la región de CA1 el número (placas/ mm^2) de placas positivas para Tioflavina-S, agrupándolas por rangos de tamaño ($<200\mu\text{m}^2$, $200-500\mu\text{m}^2$, $500-1000\mu\text{m}^2$ y $>1000\mu\text{m}^2$). En dicha cuantificación se descartó la marca menor de $10\mu\text{m}^2$, por su posible naturaleza intracelular. Se estudió la proporción (%) de placas de cada rango de tamaño con respecto al total (suma de las placas de todos los rangos en cada edad) (**Fig. 3.6**). El porcentaje de placas menores de $200\mu\text{m}^2$ (**Fig. 3.6 A**) disminuyó significativamente con la edad ($F(3,8)=46,32$, $P<0,0001$), pasando del $70,60\pm8,57\%$ a 4 meses, al $4,14\pm1,35\%$ a los 18 meses de edad ($p<0,001$). En cuanto a las placas de $200-500\mu\text{m}^2$ (**Fig. 3.6 B**) ($F(3,8)=1,107$, $P=0,4013$), se observó una ligera tendencia al aumento con la edad. Las placas de mayor tamaño ($>500\mu\text{m}^2$) (**Fig. 3.6 C y D**) aumentaban con la edad significativamente, principalmente a edades avanzadas. En el caso de placas TioS-positivas de $>1000\mu\text{m}^2$ ($F(3,8)=34,29$, $P<0,0001$), se pasó del $1,45\pm2,51\%$ a 4 meses al $39,68\pm6,20\%$ a los 18 meses ($p<0,001$). En la **figura 3.6 E** se resumen los cambios en la proporción de las placas amiloides clasificadas por tamaño en CA1. Para las placas Tioflavina-S, la proporción de placas pequeñas disminuyó de forma muy marcada con la edad a la vez que aumentó el porcentaje de placas de gran tamaño.

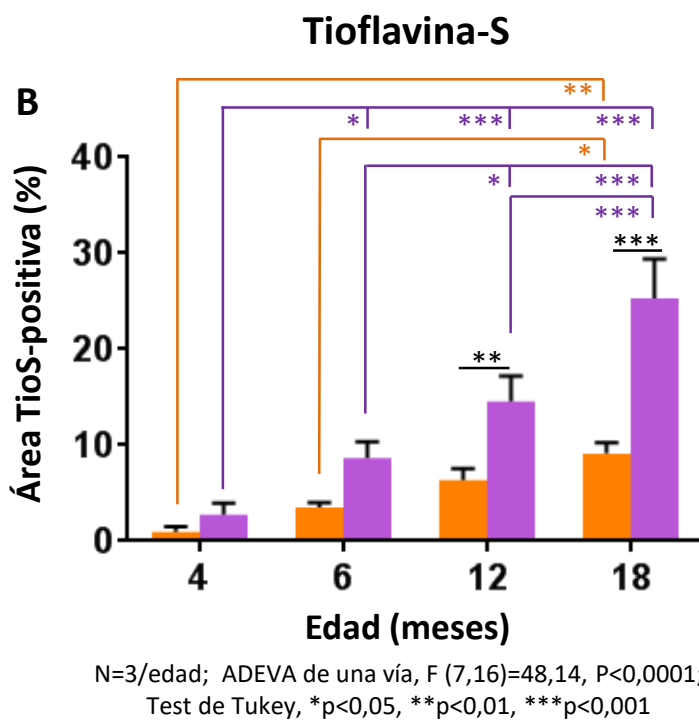
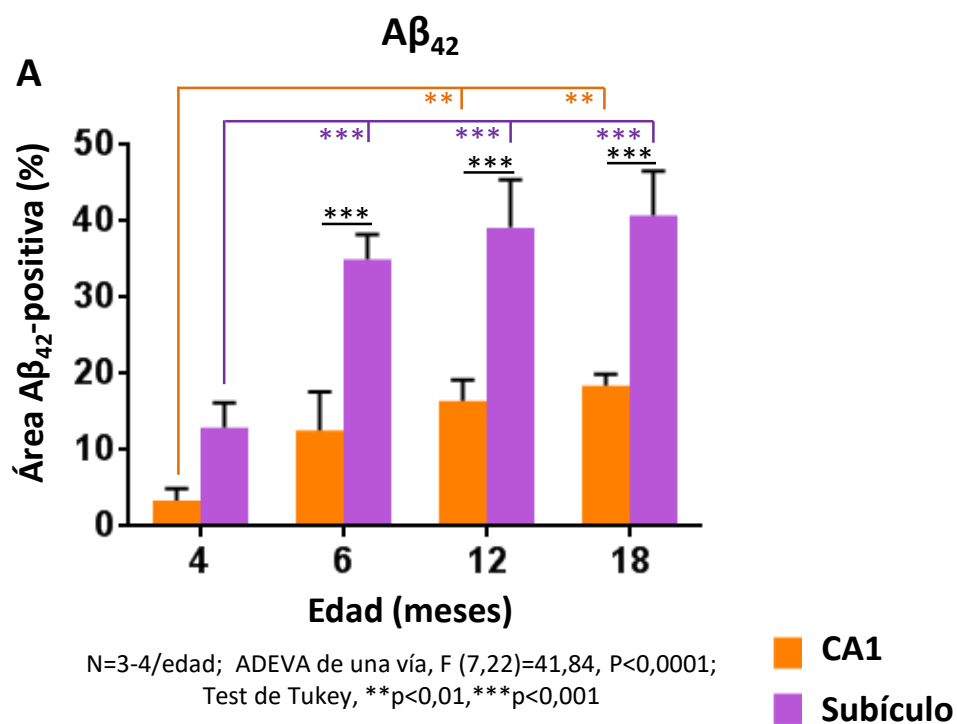


Figura 3.4. Estudio cuantitativo de la progresión de la carga amiloide de forma comparativa en CA1 y subículo de ratones APP/PS1 desde los 4 a los 18 meses de edad. La carga amiloide total analizada con el anticuerpo para A β_{42} (A) incrementa significativamente con la edad, estando el subículo más afectado que la región CA1 a todas las edades. La carga amiloide fibrilar analizada con Tioflavina-S (B) sigue un patrón similar al observado para A β_{42} , con el subículo más afectado que CA1. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

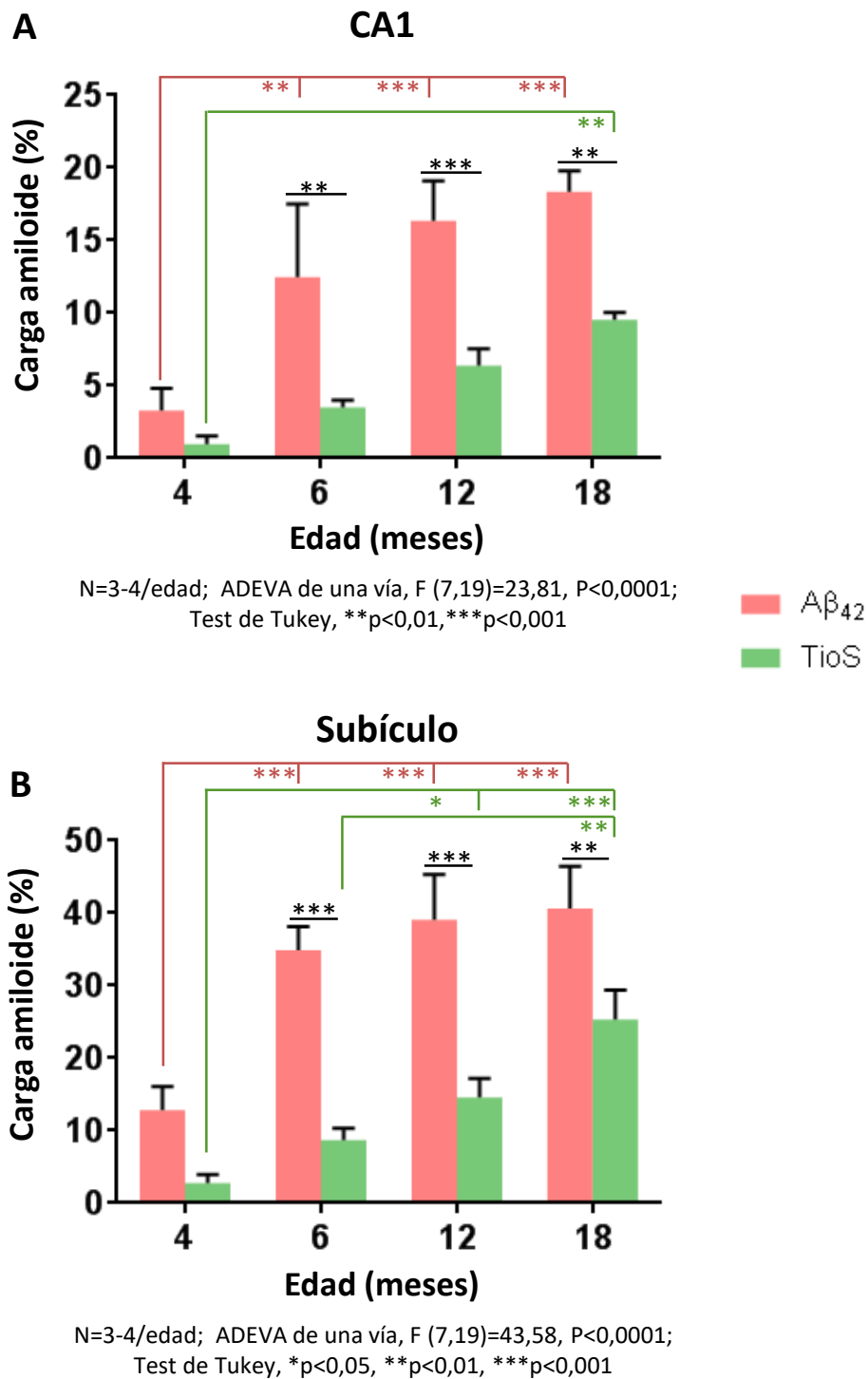
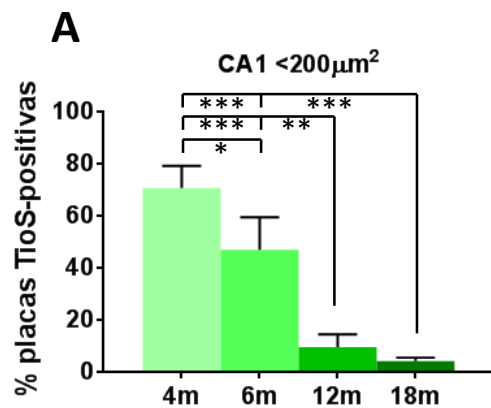
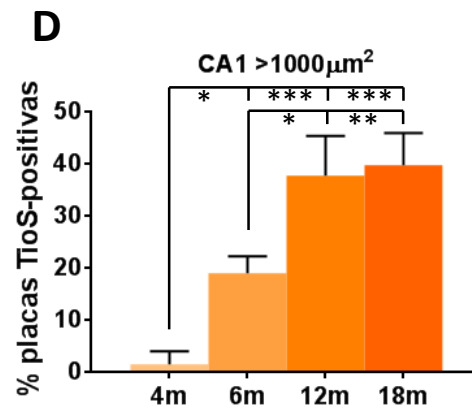


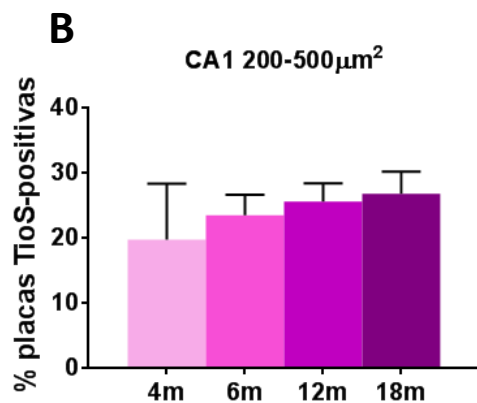
Figura 3.5. Estudio cuantitativo y comparativo de la carga amiloide total y fibrilar en el hipocampo de ratones APP/PS1 desde los 4 a los 18 meses de edad. Tanto en la región CA1 (A) como en el subículo (B), el área inmunomarcada con Aβ₄₂ (placas totales) es mayor que el área positiva para Tioflavina-S (core de placas fibrilares) a todas las edades analizadas. Los datos representados corresponden a las medias ± SD. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.



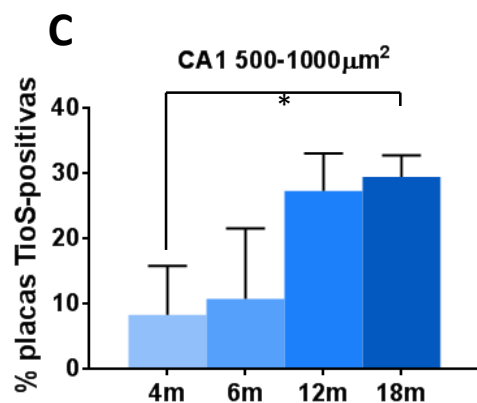
N=3/grupo; ADEVA de una vía, $F(3,8)=46,32$, $P<0,0001$; Test de Tukey, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$



N=3/grupo; ADEVA de una vía, $F(3,8)=34,29$, $P<0,0001$; Test de Tukey, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$



N=3/grupo; ADEVA de una vía, $F(3,8)=1,107$, $P=0,4013$



N=3/grupo; ADEVA de una vía, $F(3,8)=6,63$, $P=0,0146$; Test de Tukey, $*p<0,05$

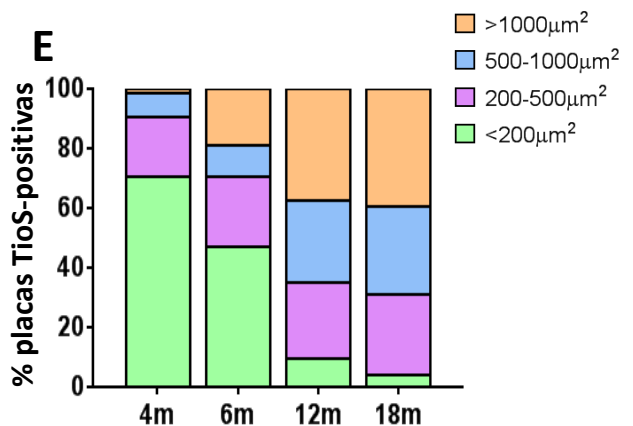


Figura 3.6. Cambios en el tamaño de las placas fibrilares TioS-positivas en la región CA1 del hipocampo de ratones APP/PS1 de los 4 a los 18 meses de edad. Se clasificaron las placas por rangos de tamaño (A: <200 μm^2 , B: 200-500 μm^2 , C: 500-1000 μm^2 , D: >1000 μm^2), eliminándose aquellas <10 μm^2 . El porcentaje de placas pequeñas (A) disminuyó significativamente con la edad, mientras que aumentó la proporción de placas de mayor tamaño (C-D). En E se representan conjuntamente los datos por edad. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

En la **figura 3.7** se muestra un doble marcaje a fluorescencia empleando anti-A β_{42} (rojo) y Tioflavina-S (verde) en un animal APP/PS1 de 6 meses. En las imágenes panorámicas del hipocampo (**Fig. 3.7 A1-2**), se aprecian diferencias entre los dos marcajes, ocupando las placas positivas para A β_{42} una mayor área que las placas TioS-positivas (más pequeñas al teñir el únicamente core), en concordancia con los resultados obtenidos al medir la carga amiloide. Se muestra también un detalle representativo de una placa amiloide (**Fig. 3.7 B1-3**) con varios núcleos fibrilares positivos para Tioflavina-S. Alrededor de dicha placa se detectó la presencia de acúmulos A β_{42} -positivos pero negativos para Tioflavina-S. No obstante, por su pequeño tamaño, podría tratarse de A β intracelular. Para determinar si las placas amiloides en el hipocampo de este modelo son preferentemente de naturaleza fibrilar (Tioflavina-S positivas), como ocurre en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, se cuantificó a 6 y 12 meses de edad el número de placas TioS-positivas/A β_{42} -positivas (fibrilares) y TioS-negativas/A β_{42} -positivas (no fibrilares) (**Fig. 3.8**). Se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia para A β_{42} combinada con tinción con Tioflavina-S a 6 y 12 meses (**Fig. 3.8 A y B**). Para ambas edades, se observó que la mayoría de placas eran fibrilares, con un núcleo TioS-positivo rodeado de un halo A β_{42} -positivo (placas TioS-positivas/A β_{42} -positivas). No obstante, algunas placas, principalmente de pequeño tamaño (<200 μm^2), eran de naturaleza no fibrilar (TioS-negativas/A β_{42} -positivas). Además, se detectó la presencia de acúmulos TioS-positivos/A β_{42} -negativos (**Fig. 3.8 C**), los cuales eran muy escasos (3% a ambas edades) y de muy pequeño tamaño (<10 μm^2), tratándose muy probablemente de marca intracelular. La cuantificación (**Fig. 3.8 D1 y D2**) del número de placas de cada tipo a 6 y 12 meses (n=300 placas/edad, 3 animales/edad) reveló que, efectivamente, la mayor parte de las placas era de tipo fibrilar (82% a 6 meses, 76% a 12 meses), mientras que las placas no fibrilares eran mucho menos numerosas (15% a 6 meses, 21% a 12 meses). La marca TioS-positiva/A β_{42} -negativa constituía solo un 3% del total de placas cuantificadas, tanto a 6 como a 12 meses.

En su conjunto, estos resultados demuestran que la patología amiloide se agrava significativamente en el hipocampo del modelo con el transcurso de la enfermedad, produciéndose un aumento en el número y tamaño de las placas. La mayoría de las placas que se forman en el hipocampo son de naturaleza fibrilar, siendo las no fibrilares principalmente de pequeño tamaño.

3.1.2. ANÁLISIS DEL HALO OLIGOMÉRICO TÓXICO QUE RODEA LAS PLACAS AMILOIDES

Para estudiar la evolución de la toxicidad de las placas amiloides durante la progresión de la patología se analizó el tamaño del halo oligomérico de las mismas, centrándonos en la región CA1 del hipocampo. En la **figura 3.9** se muestran imágenes representativas de la tinción con Tioflavina-S combinada con inmunofluorescencia con distintos anticuerpos específicos para A β (BAM10, 6E10, 4G8, y A β_{42}) en animales APP/PS1 de 12 meses de edad. Mientras que la Tioflavina-S (**Fig. 3.9 A1-D1**) se une específicamente al core fibrilar de las placas, los distintos anticuerpos que reconocen A β (**Fig. 3.9 A2-D2**) ponen de manifiesto un anillo periférico (halo) alrededor del core. Cuando se realizó inmunofluorescencia con el anticuerpo OC (reconoce A β oligomérico prefibrilar) combinada con tinción con Tioflavina-S en animales APP/PS1 (**Fig. 3.10**), se observó también el mismo patrón, el anticuerpo OC solo reconocía el halo de las

placas mientras que la Tioflavina-S se unía al core fibrilar. Esto ocurría tanto en placas de pequeño tamaño (Fig. 3.10 A) como en placas de gran tamaño (Fig. 3.10 B). Además, se realizó inmuno-oro para A β ₄₂ para microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.11) y se observó que el anticuerpo no se une a las fibras amiloides compactas del core de las placas, pero sí a las fibras presentes en la periferia (halo).

Para analizar la evolución del halo de las placas amiloides con la progresión de la patología en la región CA1 del modelo APP/PS1, se realizó un doble marcaje fluorescente con Tioflavina-S y el anticuerpo OC en animales de 4, 6, 12 y 18 meses de edad. Mediante análisis de imagen de las secciones doblemente marcadas se midió para cada placa el tamaño del core fibrilar (área TioS-positiva), el tamaño total de la placa (área OC-positiva) y el tamaño del halo (calculado como la diferencia entre área total OC-positiva y el área TioS-positiva). Las placas fueron clasificadas por rangos según el tamaño del core fibrilar (<200 μm^2 , 200-500 μm^2 , 500-1000 μm^2 , >1000 μm^2) y se analizó la evolución del tamaño del halo con la edad para cada tipo de placa (Fig. 3.12 A) (Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$). Se observó que el tamaño del halo de las placas era proporcional al tamaño del core, cuanto mayor era el tamaño del core, mayor era el tamaño del halo. Así, las placas con un core grande (>1000 μm^2) tenían un halo mucho mayor que las placas de core pequeño (<200 μm^2), a todas las edades estudiadas (4m: 6,97 \pm 2,09 veces; 6m: 10,55 \pm 5,38 veces; 12m: 7,27 \pm 2,58 veces; 18m: 6,81 \pm 4,84 veces). No se observaron diferencias en el tamaño del halo debidas a la edad de los animales, es decir, dentro de un mismo rango de tamaño no ocurría un aumento del halo con la edad. En la figura 3.12 B se muestra la relación entre el tamaño del core TioS-positivo y el tamaño del halo de las placas. Se observó que cuanto mayor era el tamaño del core fibrilar, mayor era el tamaño del halo (correlación de Pearson, $r = 0,804$, $P < 0,0001$). Además, aunque a todas las edades se encontraron placas de tamaño pequeño/mediano, en los animales de 18 meses de edad abundan las placas con un core y un halo mayor. Por otro lado, se analizó la evolución con la edad del área del core (Fig. 3.13 A), el área total (Fig. 3.13 B) y el área del halo (Fig. 3.13 C) de las placas amiloides. Se observó que todas estas áreas aumentaban con la edad, siendo significativamente mayores a los 18 meses en comparación con el resto de las edades ($p < 0,001$). En la Fig. 3.13 D se muestra la evolución de la densidad de placas (n°/mm^2), el tamaño del core y el tamaño del halo de las placas con la progresión de la patología. Se obtuvo que la densidad de placas se incrementaba con la edad en la región CA1 del hipocampo, a la vez que ocurría un aumento en tamaño de las placas amiloides, crecimiento que ocurría tanto en el core como en el halo de forma exponencial.

Todos estos datos indican que las placas son estructuras dinámicas, que no sólo aumentan en número y tamaño con la progresión de la patología, sino que también podrían cambiar su toxicidad, medida como tamaño del halo oligomérico.

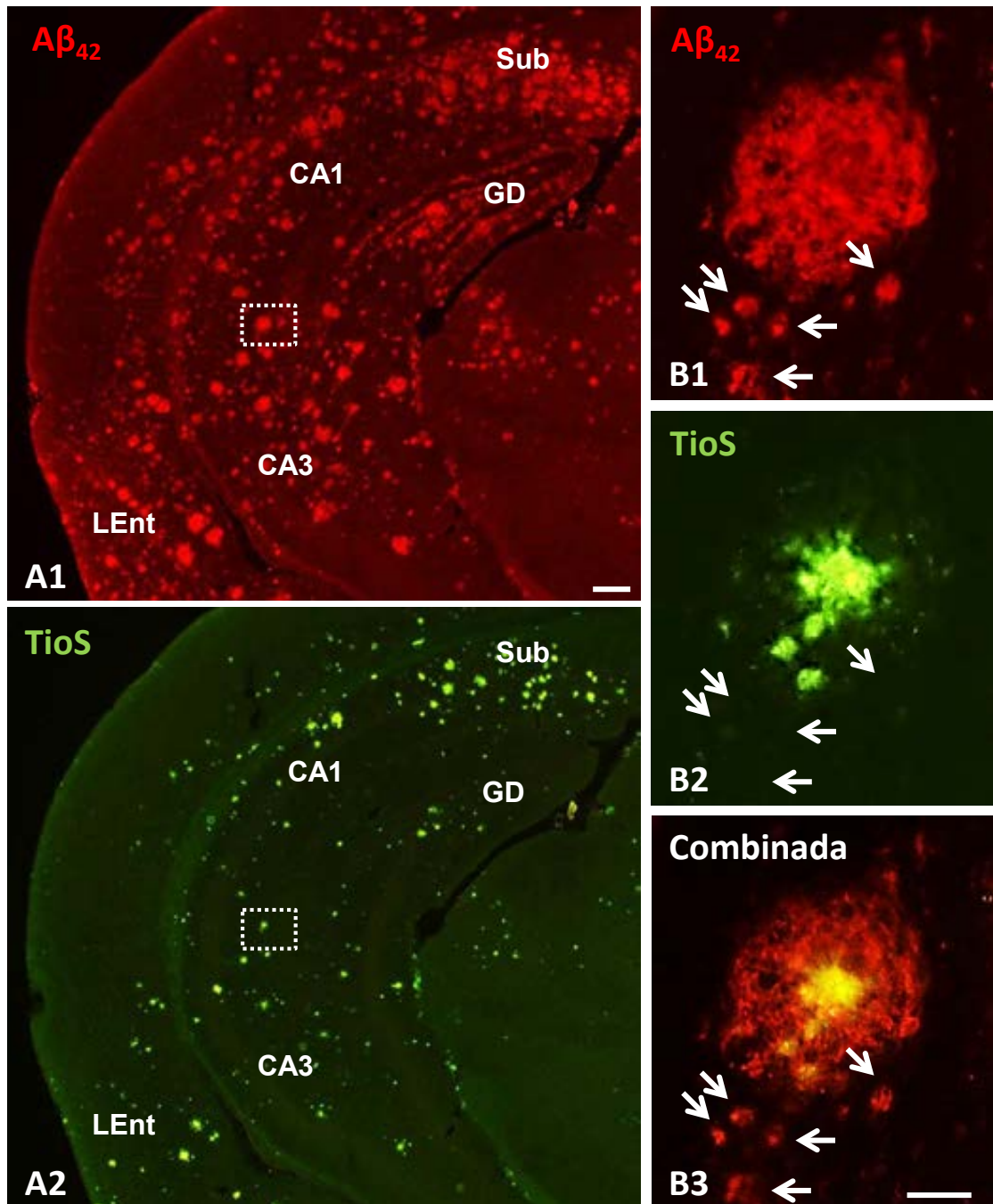


Figura 3.7. Imágenes comparativas de la patología amiloide en el hipocampo de APP/PS1 de 6 meses de edad. Doble marcaje fluorescente con anti- $A\beta_{42}$ (A1) y Tioflavina-S (A2) en una misma sección de hipocampo. Con la inmunotinción para $A\beta_{42}$ se visualizan todas las placas amiloides mientras que con la tinción de Tioflavina-S se marca el core de las placas de tipo fibrilar. Se muestra en mayor detalle una placa amiloide con core TioS-positivo (B1-B3). Las flechas indican pequeños acúmulos de $A\beta_{42}$ que son negativos para Tioflavina-S. Sub: subículo, CA1: región 1 del asta de Ammon, CA3: región 3 del asta de Ammon, GD: giro dentado, LEnt: corteza entorrinal lateral. Microscopía de epifluorescencia. Barras de escala: 200 μm (A1-2) y 25 μm (B1-3).

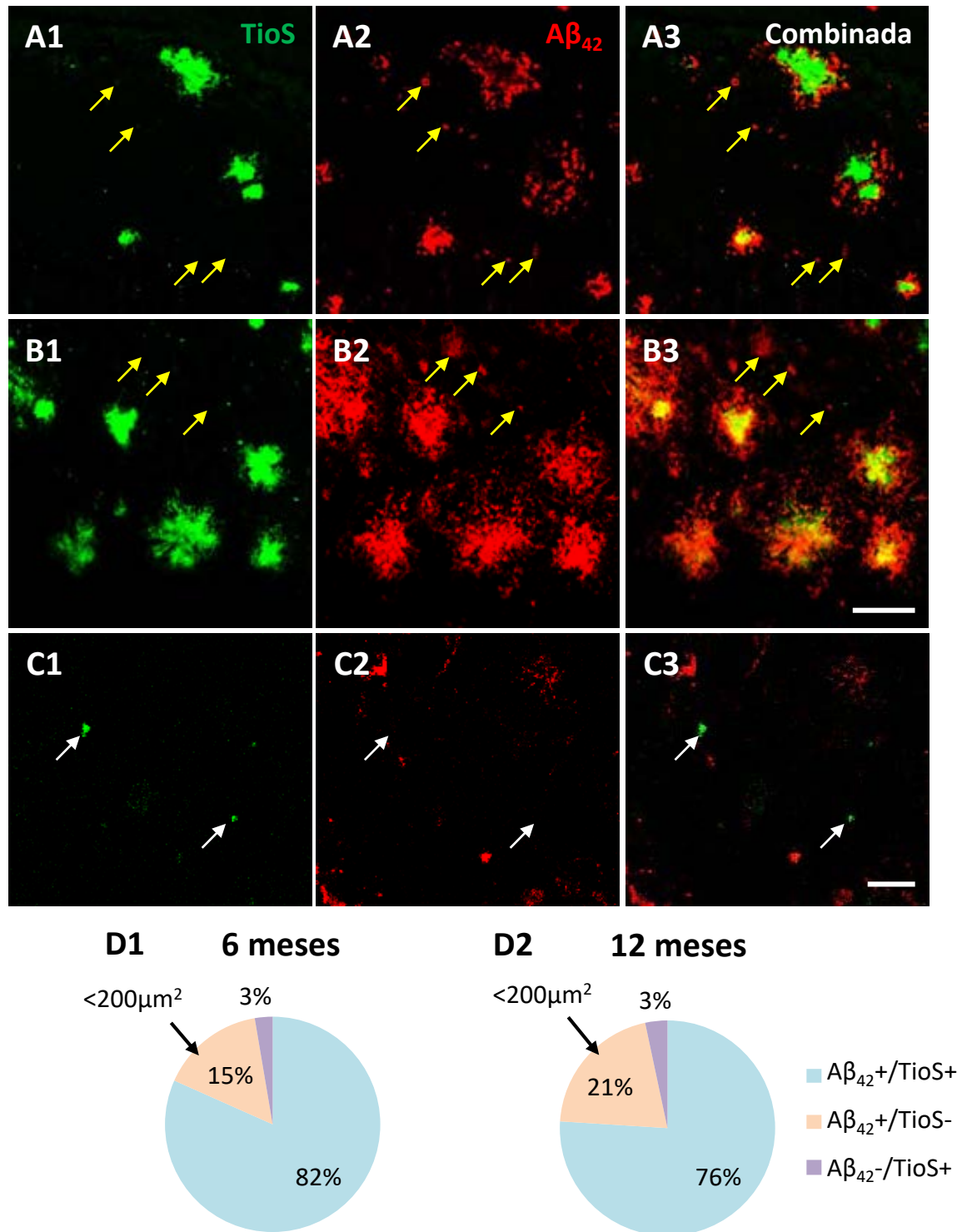


Figura 3.8. La mayoría de las placas amiloides poseen core fibrilar TioS-positivo en el hipocampo del modelo APP/PS1. Doble tinción fluorescente con Tioflavina-S y anti-Aβ₄₂ a 6 (A) y 12 (B) meses de edad y detalle a 12 meses (C). A microscopía confocal se observó la presencia de placas Aβ₄₂-positivas/TioS-positivas (fibrilares) y placas Aβ₄₂-positivas/TioS-negativas (no fibrilares, flechas amarillas). Un pequeño porcentaje se corresponde con estructuras Aβ₄₂-negativas/TioS-positivas (flechas blancas) de muy pequeño tamaño y que podría ser de naturaleza intracelular. La cuantificación del número de placas (D) (300 placas/edad, n=3 animales) reveló que la mayoría de ellas eran de tipo fibrilar, y que aquellas que no eran fibrilares se corresponden con la placas muy pequeñas <200 μm². Barras de escala: 50 μm (A-B) y 10 μm (C).

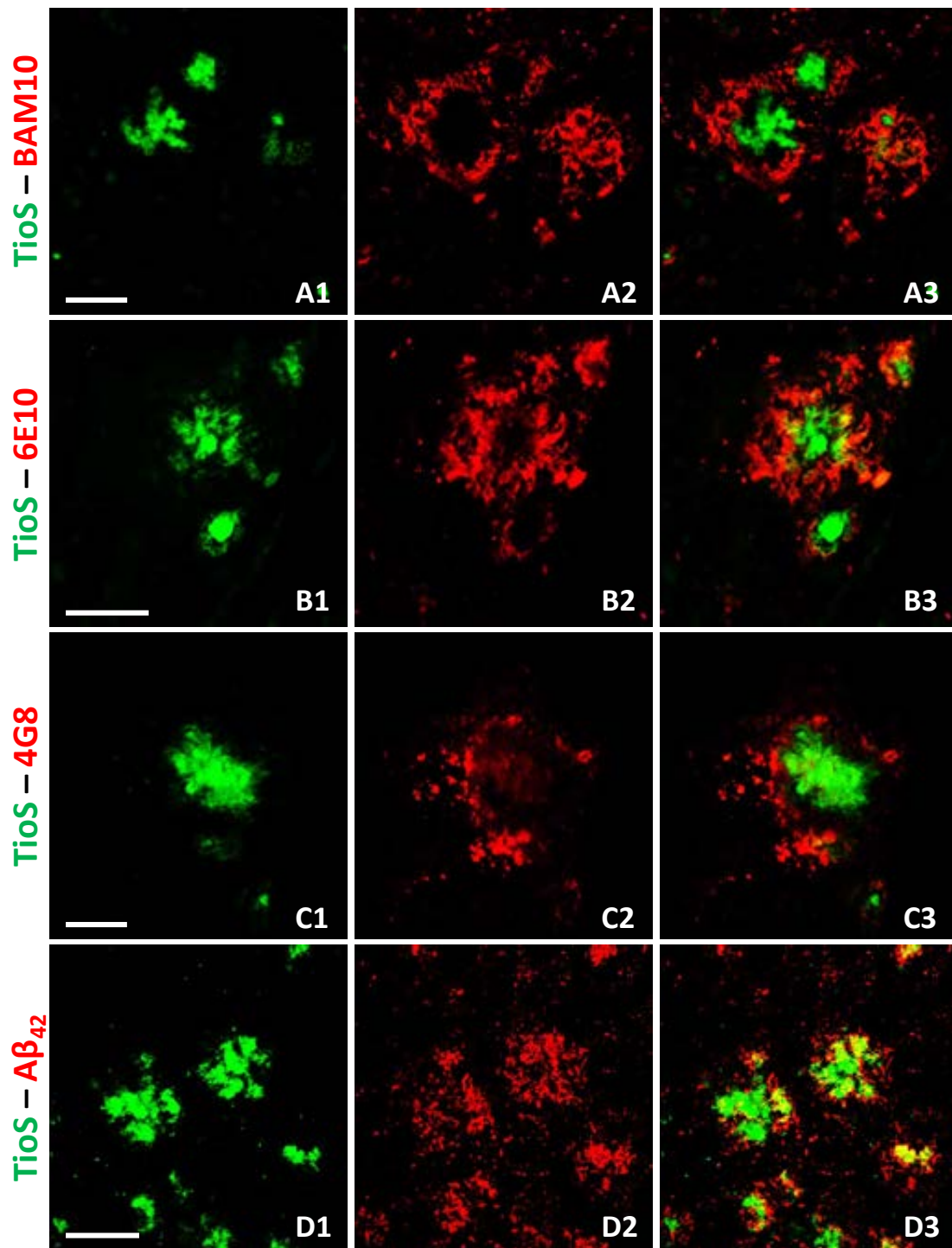


Figura 3.9. Las placas fibrilares poseen un halo de A β que es negativo para Tioflavina-S. Inmunofluorescencia con diferentes anticuerpos para A β combinada con tinción de Tioflavina-S en la región CA1 del hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad. La Tioflavina-S (TioS) tiñe el núcleo fibrilar de las placas (**A1-D1**; en verde), mientras que los distintos marcadores de A β , BAM10 (**A2**), 6E10 (**B2**), 4G8 (**C2**) y A β_{42} (**D2**), marcan preferentemente la periferia (halo; en rojo) de las placas. Microscopía confocal. Barras de escala: 50 μ m.

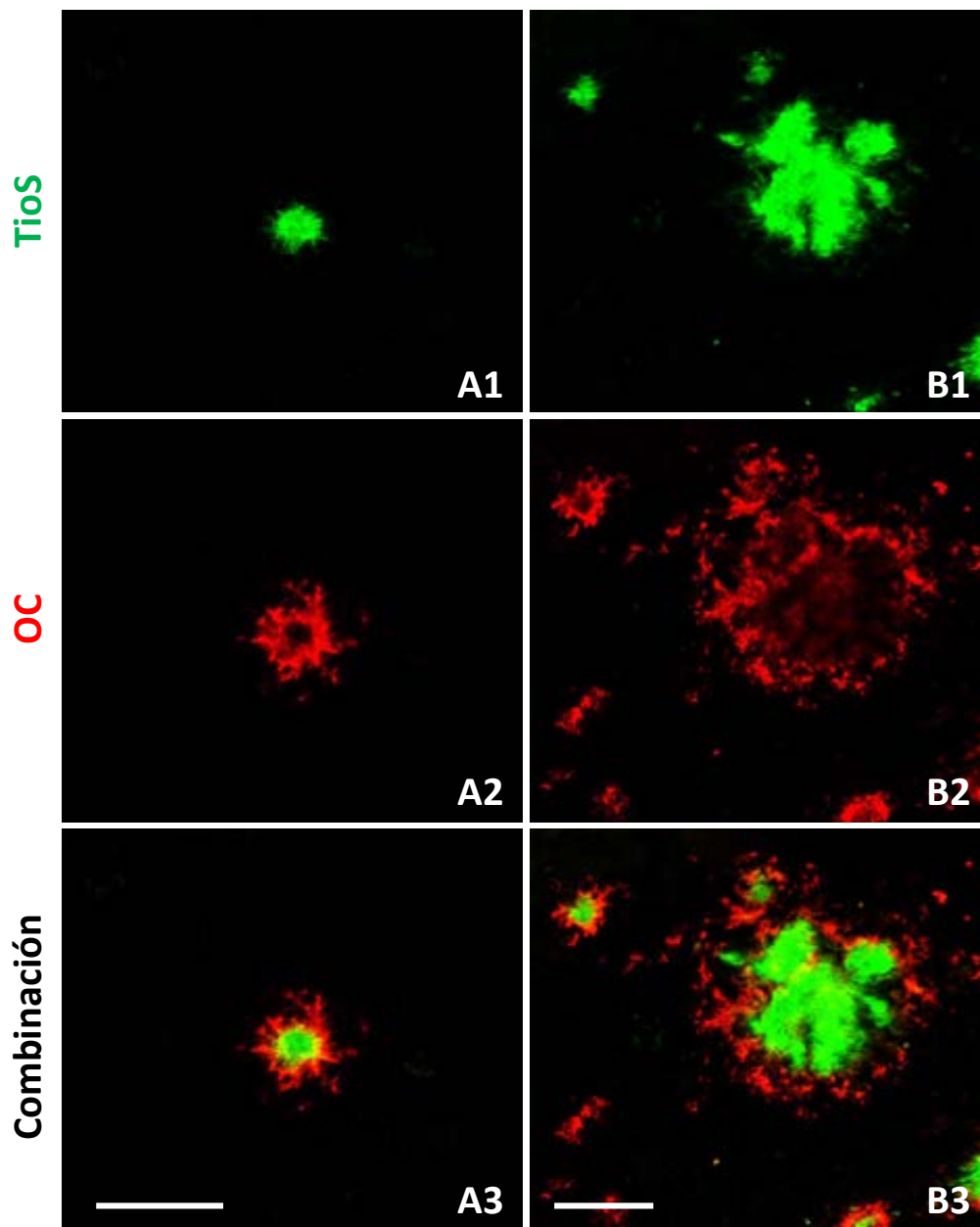


Figura 3.10. El halo de las placas fibrilares está formado por A β oligomérico. Doble marcaje fluorescente para A β oligomérico y tinción de Tioflavina-S en la región CA1 de animales APP/PS1. La Tioflavina-S (TioS) tiñe el núcleo fibrilar de las placas (en color verde), mientras que el A β oligomérico (anticuerpo OC) está presente en la periferia (halo) de las placas (en color rojo). A la izquierda (**A**) se muestra una placa pequeña de aproximadamente 200 μm^2 presente en un animal de 4 meses de edad, y a la derecha (**B**) una placa grande, de más de 1000 μm^2 , de un animal de 6 meses. Microscopía confocal. Barras de escala: 25 μm .

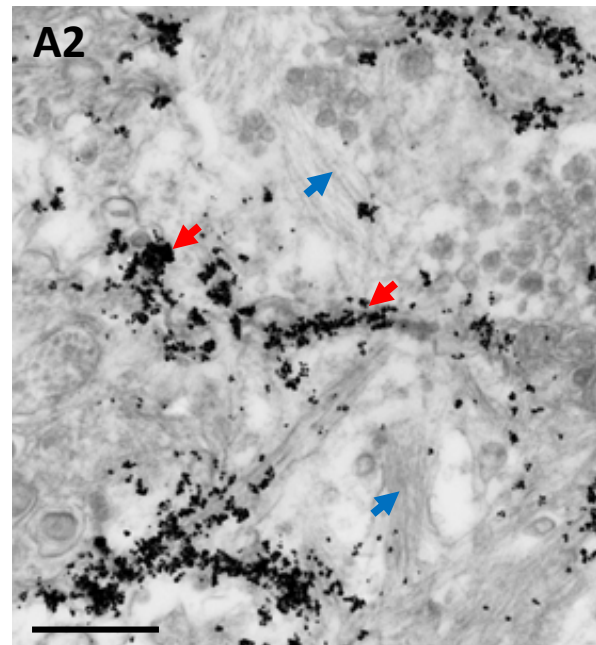
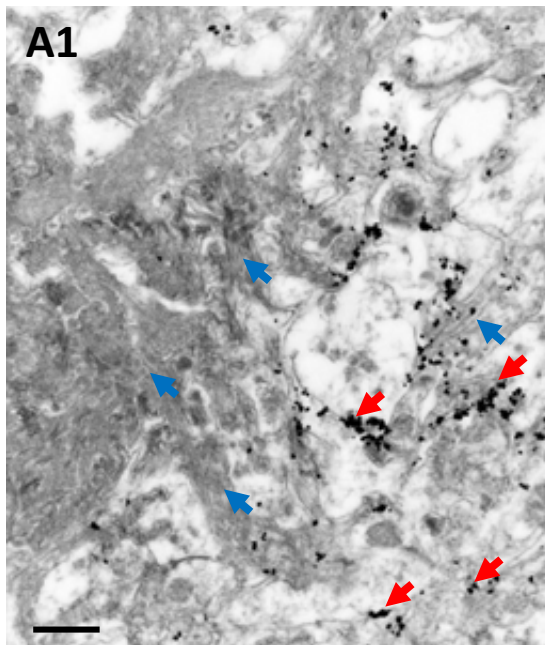
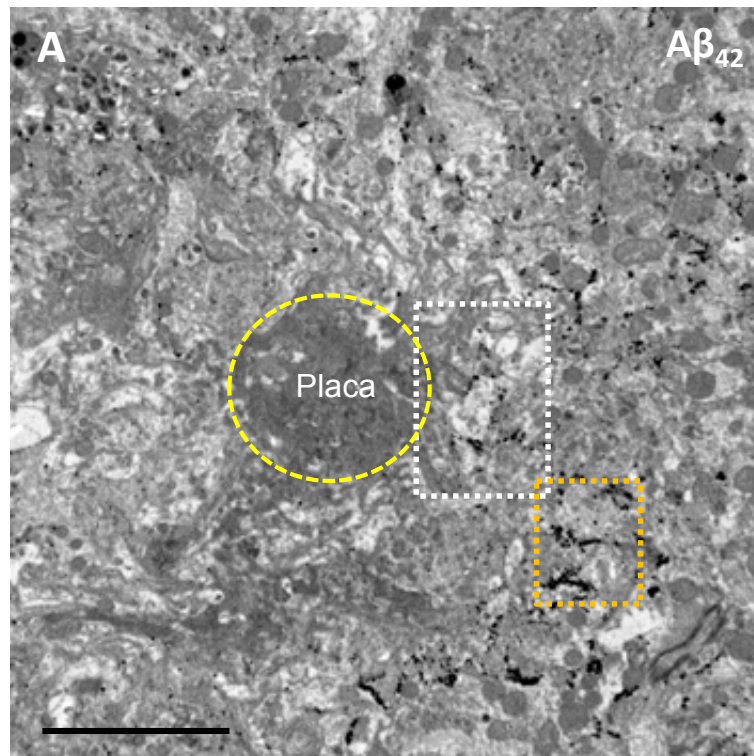


Figura 3.11. A nivel ultraestructural la inmunotinción para A β se localiza en las fibras amiloides de la periferia de las placas. Inmuno-oro para A β_{42} a microscopía electrónica de transmisión en el hipocampo de APP/PS1 de 12 meses de edad. El marcaje se visualiza en las fibras amiloides del halo periférico localizadas en el espacio extracelular entre las prolongaciones astrogliales y microgliales. **A**, imagen panorámica de una placa amiloide cuyo core se delimita con un círculo amarillo. **A1** y **A2** son imágenes a mayores aumentos de las zonas periféricas de la placa delimitadas con los recuadros blanco y naranja, respectivamente. Flechas azules: fibras amiloides, flechas rojas: inmunomarcaje. Barras de escala: 5 μ m (A) y 0,5 μ m (A1 y A2).

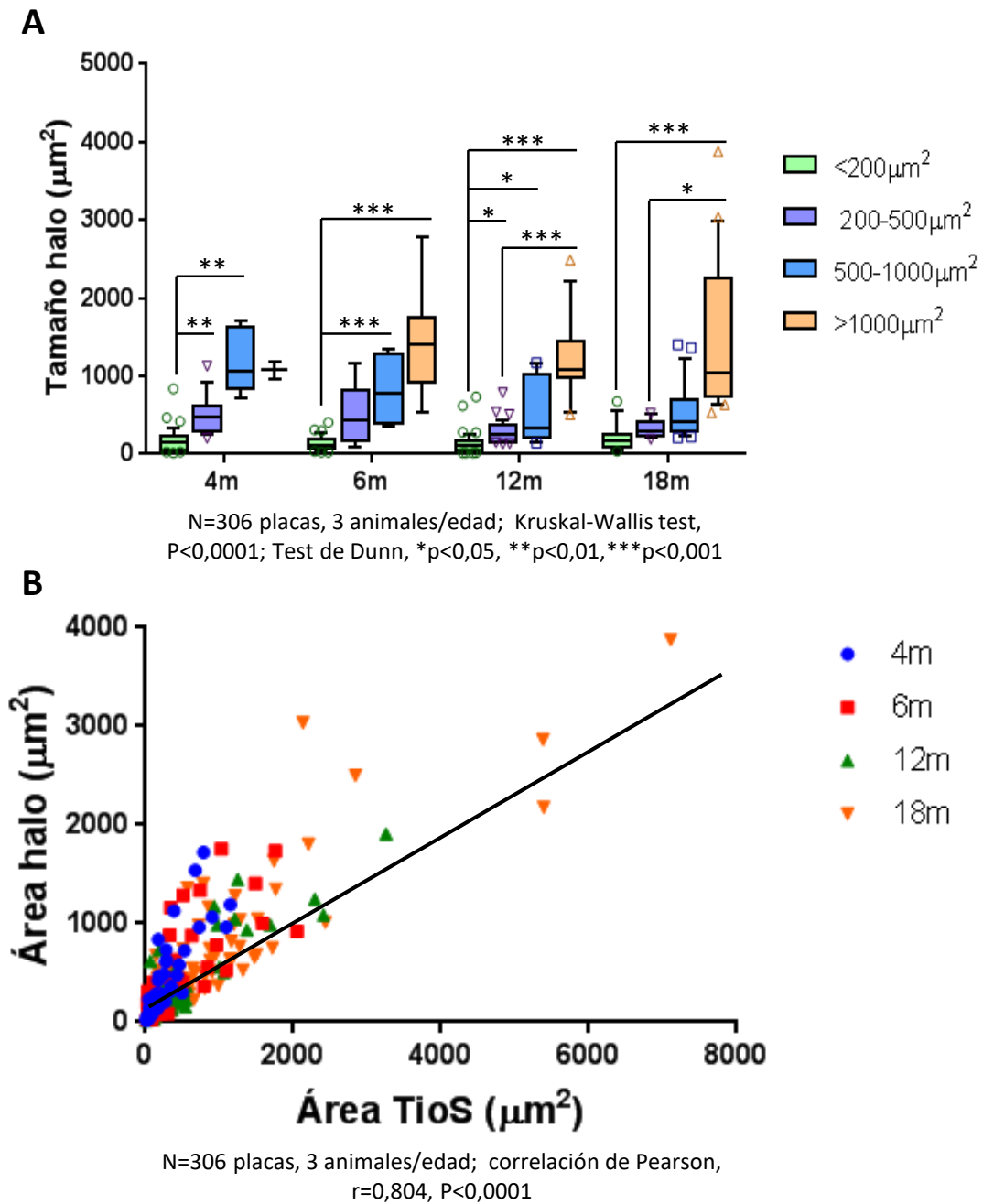


Figura 3.12. Estudio del tamaño del halo oligomérico que rodea a las placas amiloides empleando los marcadores anti-A β oligomérico (OC) y Tioflavina-S. Se clasificaron las placas por rangos en función del tamaño del core TioS-positivo (A). En general, el tamaño del halo (diferencia entre el tamaño total de la placa OC-positiva y el de su core TioS-positivo) fue proporcional al tamaño del core, independientemente de la edad de los animales. Los datos representados en cajas corresponden a los percentiles 25, 50 y 75 (A). A edades tempranas (4-6 meses) las placas presentaban un core más pequeño y también un halo menor que a 12-18 meses (B). La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

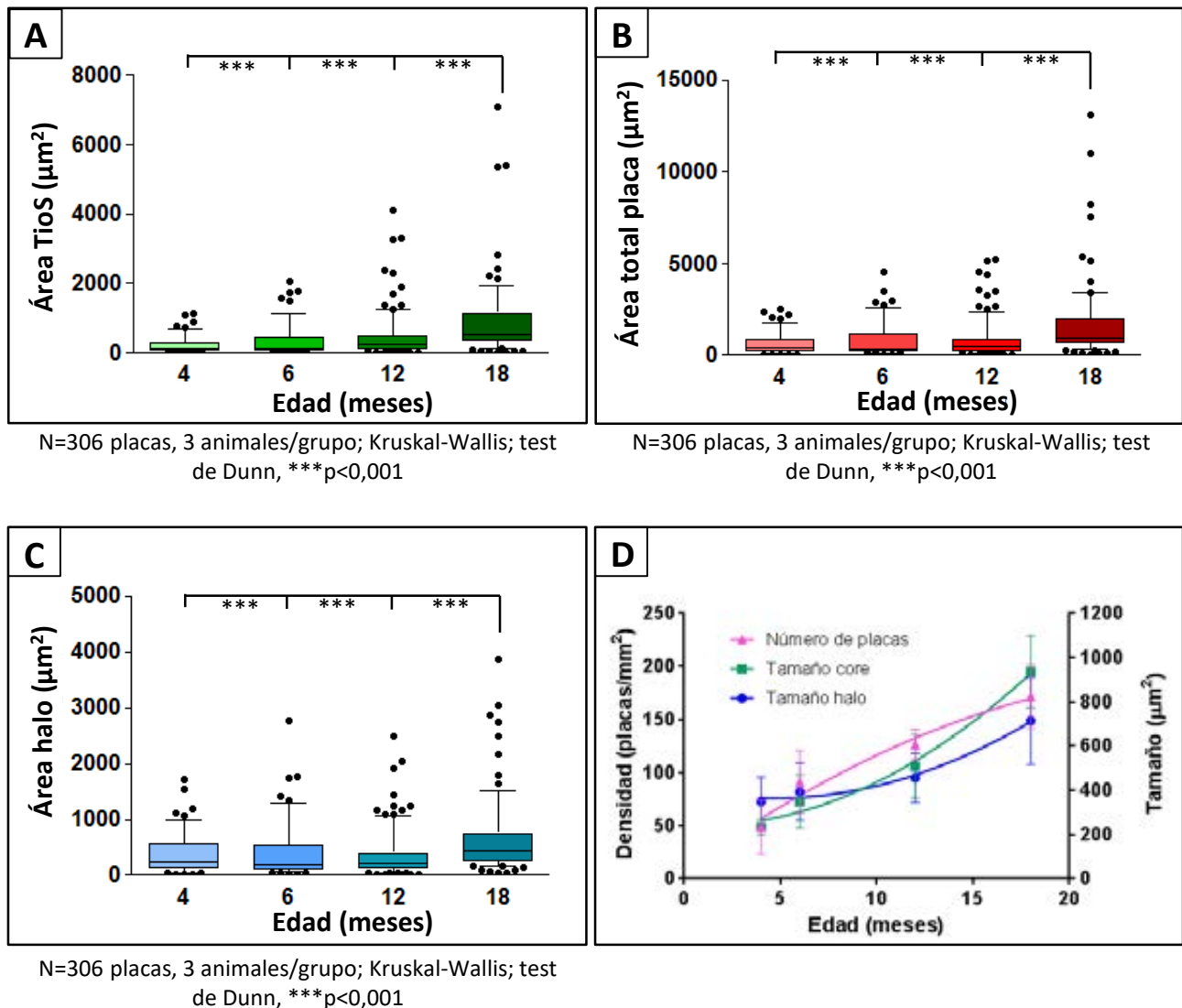


Figura 3.13. Análisis de la dinámica de las placas amiloides fibrilares durante la progresión de la patología en la región CA1 del hipocampo del modelo APP/PS1. Se cuantificó el área marcada con Tioflavina-S (A), el área total de la placa (OC + TioS) (B) y el área del halo oligomérico (C) en ratones de 4, 6, 12 y 18 meses de edad. Se observó que, en los tres casos, el área era significativamente mayor a 18 meses que en el resto de edades ($p < 0,001$ en todos los casos). Los datos representados en cajas corresponden a los percentiles 25, 50 y 75 (A-C). La estadística y significancia se indican en las gráficas. Evolución con la edad del número de placas amiloides, el tamaño del core y el tamaño del halo oligomérico en la región CA1 de ratones PS1/APP (D). Analizando la evolución con la edad de la densidad de placas amiloides (rosa), el tamaño del core (verde) y el halo oligomérico (azul), se observó que la densidad de placas aumentaba progresivamente con la edad. Los tamaños del core y del halo oligomérico de las placas también aumentaban con la edad pero de forma más exponencial. En la gráfica (D) se representan las medias \pm SD ($n=3$ animales/edad).

3.1.3. ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD DE LA PLACA: INDUCCIÓN DE NEURITAS DISTRÓFICAS

Con objeto de determinar si el aumento del halo oligomérico conlleva una mayor toxicidad de la placa, se analizó la patología neurítica asociada a las placas. Mediante inmunomarcaje doble a campo claro empleando anti-A β ₄₂ (marca las placas amiloides) y anti-APP (marcador de neuritas distróficas) se observó que la inmensa mayoría de las placas amiloides en el modelo APP/PS1 presentaban una corona de neuritas distróficas APP-positivas a su alrededor, tanto a 6 como a 12 meses de edad (Fig. 3.14 y 3.15 A). A microscopía electrónica de transmisión se identifican las neuritas distróficas (Fig. 3.15 B) por su gran tamaño y contenido vesicular (Fig. 3.16). Las distrofias son de origen axonal/presináptico (Sanchez-Varo et al. 2012), por lo que es frecuente observar axones mielínicos distróficos (Fig. 3.17).

Con el fin de estudiar el efecto tóxico de las placas amiloides sobre los axones/sinapsis del parénquima adyacente, se realizó un estudio cuantitativo de las neuritas distróficas que rodean las placas utilizando un doble marcaje con rojo Congo (colorante que tiñe las placas fibrilares), y el anticuerpo anti-APP (marcador de neuritas distróficas). En la figura 3.18 se muestran imágenes panorámicas de la región CA1 de animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad con este doble marcaje. Mediante técnicas estereológicas, se cuantificó el tamaño de las placas amiloides y el número de distrofias que presentaban a su alrededor (Fig. 3.19). Este estudio, realizado en el modelo APP/PS1 a 4, 6, y 12 meses de edad, reveló que existía relación entre el tamaño de las placas y el número de distrofias a su alrededor. Cuanto mayor era el tamaño de la placa, mayor era también el número de distrofias totales en su vecindad (correlación de Pearson, $r=0,827$, $P=0,01$). Además, en los animales de edad avanzada (12 meses), había más placas de gran tamaño, que tenían por tanto un mayor número de distrofias a su alrededor (Fig. 3.19 A). Al analizar la densidad de distrofias, calculada como el número de distrofias por perímetro (μm) de placa, se obtuvo que dicha densidad disminuía de forma significativa con la edad ($F(82,146)=6,587$, $P=0,0018$), siendo menor a los 12 meses en comparación con 4 y 6 meses ($p<0,05$) (Fig. 3.19 B).

En su conjunto, estos resultados sugieren que la toxicidad de las placas amiloides (medida como número de neuritas distróficas a su alrededor) depende del tamaño de las mismas, de forma que a mayor tamaño inducen una mayor degeneración de los axones/sinapsis vecinas. Sin embargo, con la edad las placas no aumentan su reactividad, de hecho a los 12 meses de edad (patología avanzada) las placas tienen menor número de distrofias por μm de perímetro de placa, lo cual puede ser reflejo de un mayor proceso neurodegenerativo en las fases avanzadas de la enfermedad.

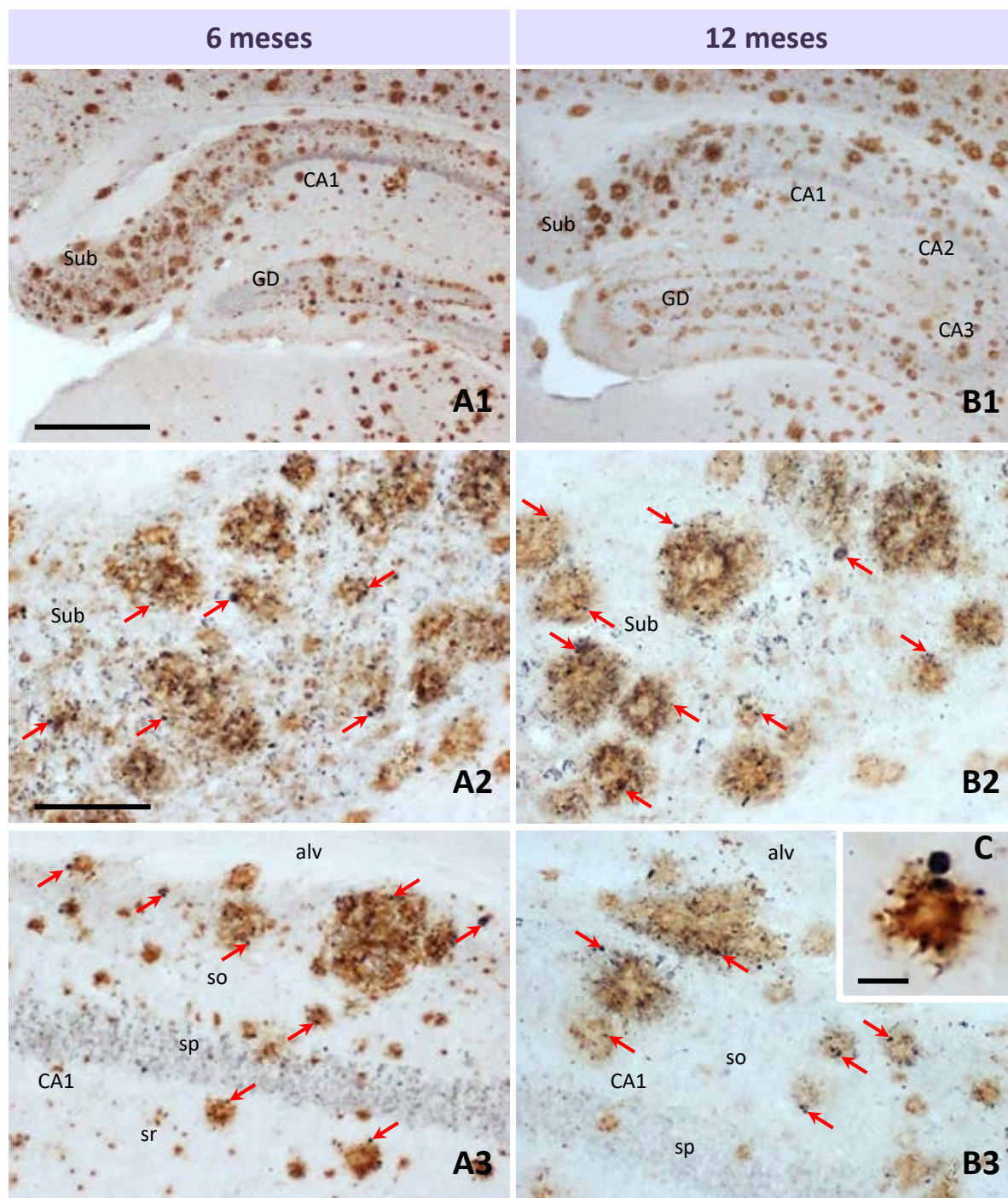


Figura 3.14. Las placas amiloides están rodeadas por neuritas distróficas en el hipocampo de ratones **APP/PS1**. Mediante una inmunohistoquímica doble a campo claro se marcaron las placas amiloides (anti- $A\beta_{42}$) en color marrón y las neuritas distróficas (anti-hAPP) en gris azulado. Se muestra una vista panorámica del hipocampo a 6 meses (**A1**) y a 12 meses (**B1**). A mayores aumentos, tanto en subículo (**A2** y **B2**) como en CA1 (**A3** y **B3**) se observa que la inmensa mayoría de las placas amiloides son de naturaleza neurítica (están rodeadas de distrofias neuronales APP-positivas, flechas rojas). Se muestra un detalle de una placa amiloide rodeada de distrofias neuríticas (**C**). CA1-CA3: regiones del asta de Ammon, GD: giro dentado, alv: alveus, Sub: subículo, so: estrato oriens, sp: estrato piramidal, sr: estrato radiado. Barras de escala: 500 μ m (**A1** y **B1**), 100 μ m (**A2-3** y **B2-3**) y 10 μ m (**C**).

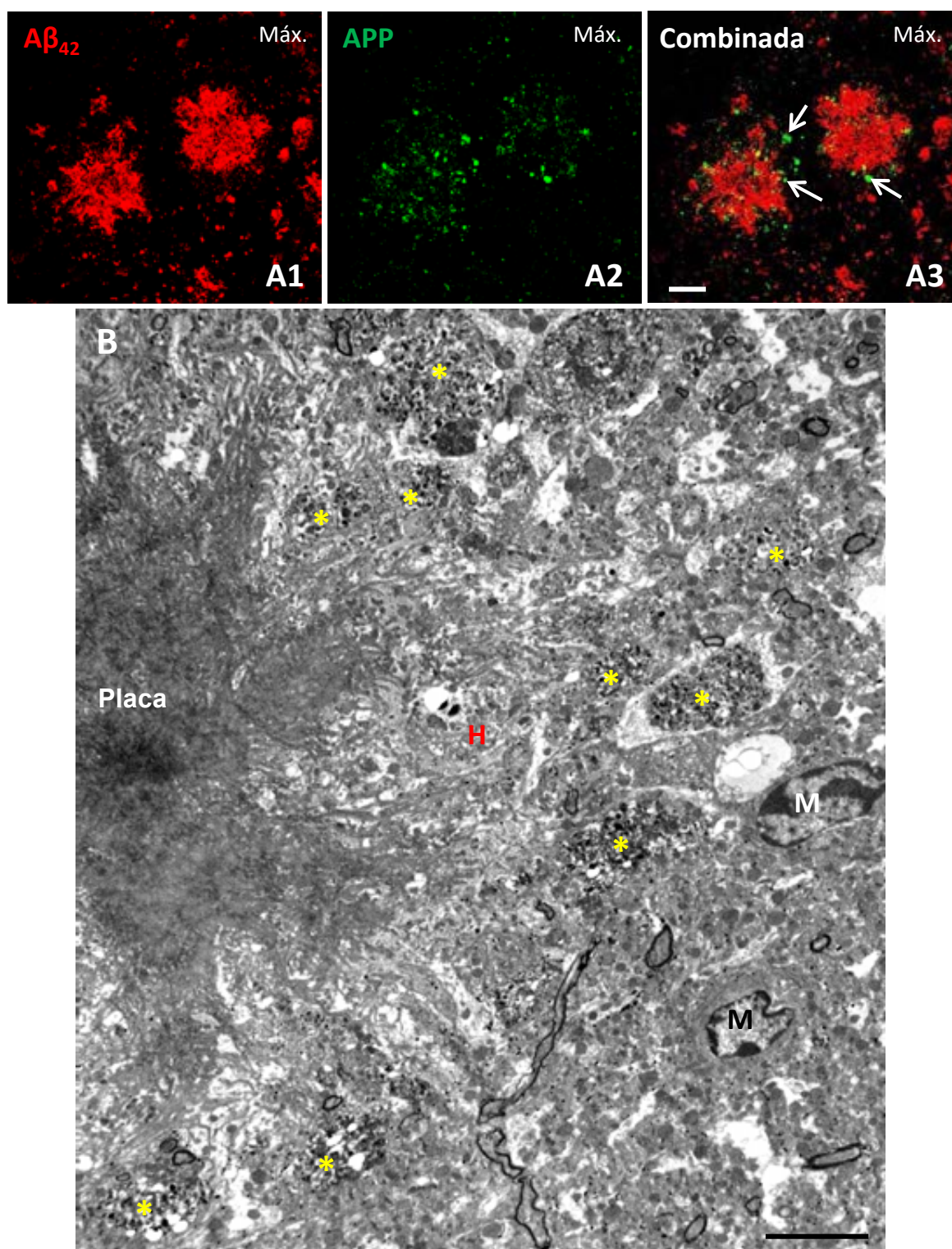


Figura 3.15. Las placas amiloides en el modelo APP/PS1 están rodeadas de neuritas distróficas. **A**, mediante microscopía confocal e inmunofluorescencia doble para Aβ₄₂ (rojo, **A1**) y APP (verde, **A2**), se observa la presencia de neuritas distróficas (flechas blancas) alrededor de las placas amiloides (**A3**, imagen en proyección máxima). **B**, se muestra a microscopía electrónica de transmisión una placa de gran tamaño rodeada de numerosas distrofias (asteriscos). H: halo, M: microglía. Barras de escala: 25 μm (A1-A3) y 5 μm (B).

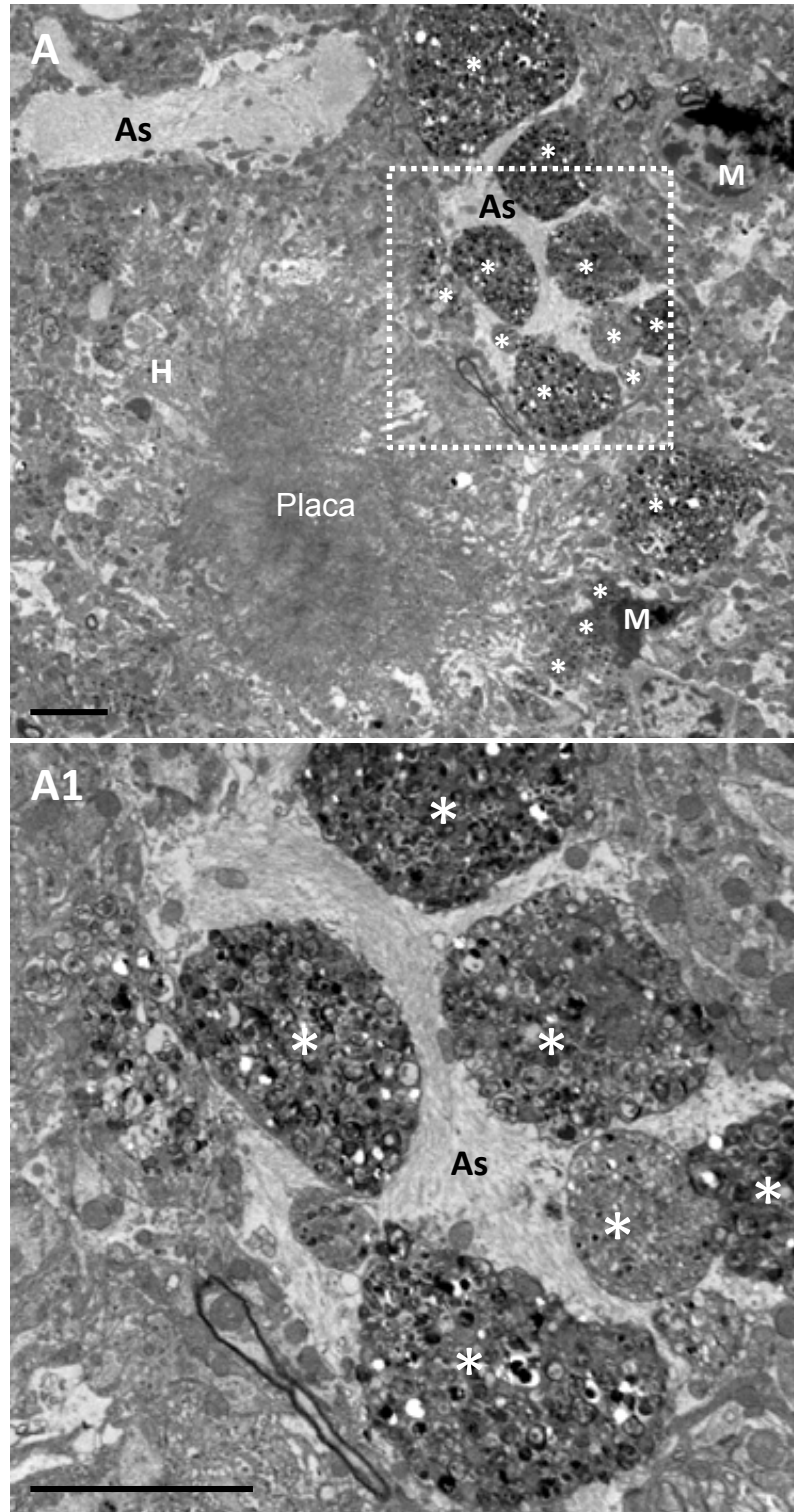


Figura 3.16. Neuritas distróficas englobadas en el citoplasma de prolongaciones astrogliales. Microscopía electrónica de transmisión. **A**, panorámica de placa amiloide con neuritas distróficas. **A1**, detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en **A**, donde se pueden ver varias neuritas distróficas (asteriscos) en el interior de una prolongación astroglial identificada por su citoplasma poco electrodenso y la presencia de filamentos intermedios. As: astrocito, H: halo de la placa, M: microglía. Barras de escala: 5 μ m.

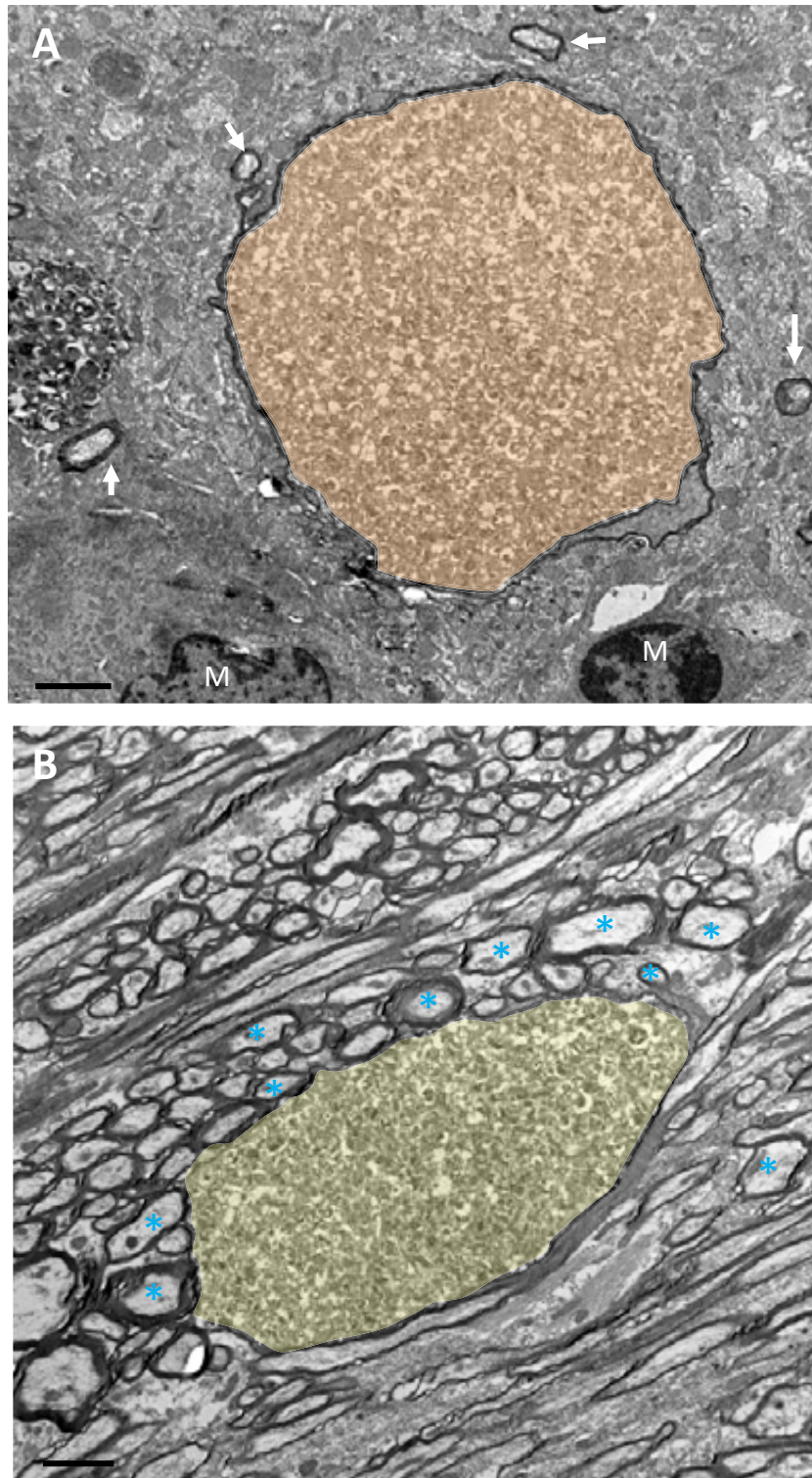


Figura 3.17. Axones mielínicos distróficos en el hipocampo del modelo APP/PS1. Microscopía electrónica de transmisión. Las neuritas distróficas son de origen axonal. En **A** y **B** se muestran dos axones mielínicos distróficos de gran tamaño (coloreados). Se puede comparar su tamaño con el de axones mielínicos normales localizados a su alrededor (flechas blancas en A, y asteriscos en B). B es la zona del alveus, región con abundantes tractos axonales. M: microglía. Barras de escala: 2 μ m.

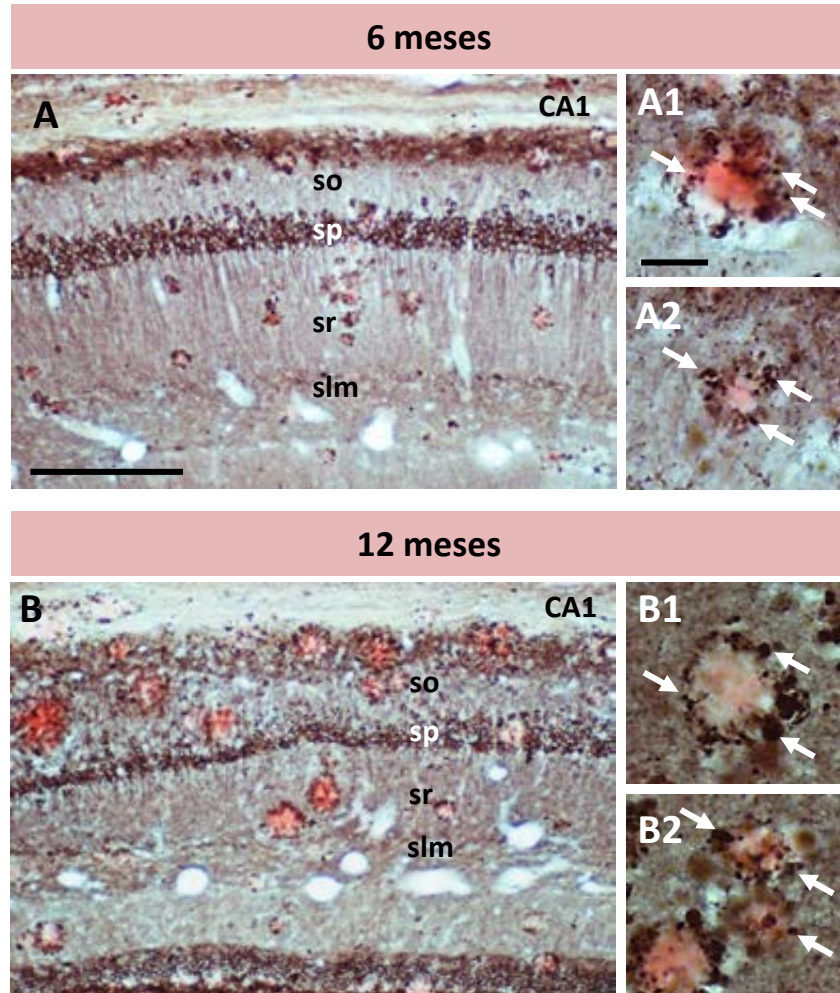
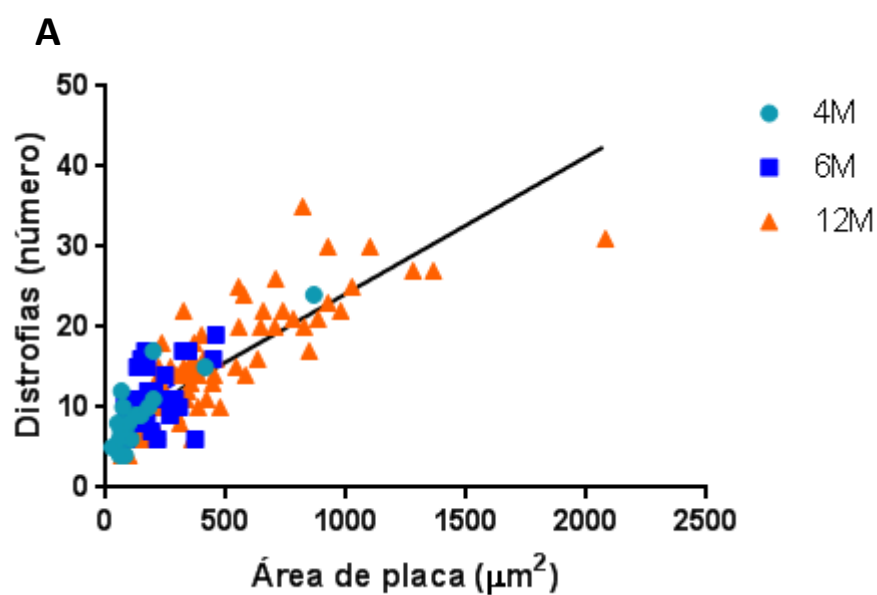
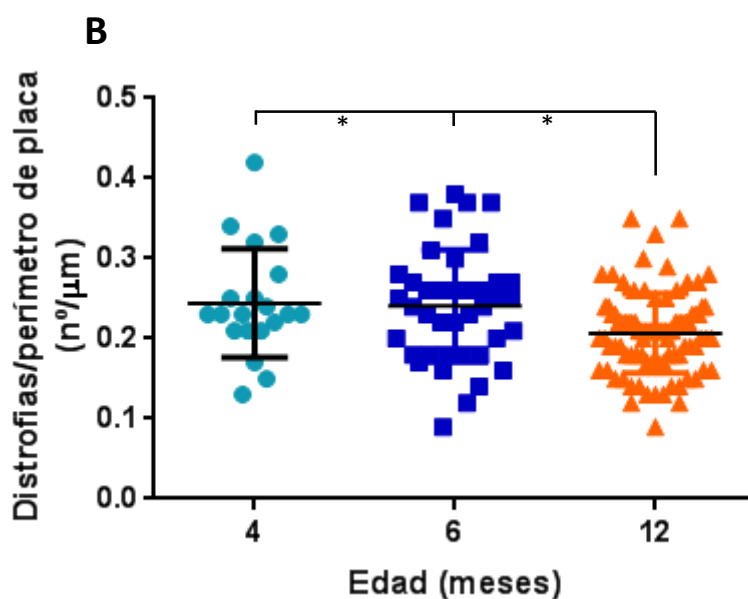


Figura 3.18. La cantidad y tamaño de las placas neuríticas aumenta con la progresión de la patología en el hipocampo del modelo APP/PS1. Doble marcaje mediante inmunohistoquímica para anti-APP combinada con tinción con rojo Congo en el hipocampo de animales APP/PS1. El rojo Congo se une a las fibras amiloides de las placas, mientras que APP marca las neuritas distróficas (flechas). Se muestran imágenes panorámicas de la región CA1 del hipocampo a 6 (A) y 12 meses (B) y detalles a mayores aumentos de placas rodeadas de distrofias (6 meses: A1-2, 12 meses: B1-2). CA1: región 1 del asta de Ammon, slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens, sp: estrato piramidal, sr: estrato radiado. Barras de escala: 200 µm (A y B) y 25 µm (A1-2, B1-2).



N=149 placas; correlación de Pearson, $r=0,827$, $P=0,01$



N=149 placas; ADEVA de una vía, $F(82,146)=6,587$,
 $P=0,0018$; Test de Tukey, $*p<0,05$

Figura 3.19. Estudio cuantitativo de la relación entre el número de neuritas distróficas y el tamaño de las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1. Mediante inmunohistoquímica con anti-APP (marcador de distrofias) combinada con tinción de rojo Congo (placas), se cuantificó el número de distrofias alrededor de las placas amiloides y el tamaño de los depósitos amiloides. Se observó que las placas tenían un tamaño mayor a 12 meses, y que cuánto mayor era el tamaño de estas, mayor era el número de distrofias a su alrededor (A). Sin embargo, cuando se analizó el número de distrofias por unidad de perímetro de placa, se observó que la densidad de distrofias por placa no aumentaba con la edad, sino que disminuía significativamente (B). La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

3.1.4. ANÁLISIS METABOLÓMICO

Con objeto de determinar si la patología amiloide induce cambios en el perfil metabolómico de nuestro modelo APP/PS1 se ha realizado un estudio en colaboración con la unidad de imagen del Bionand de Málaga. Este análisis se realizó empleando la espectroscopía de protones por resonancia magnética de alta resolución en ángulo mágico (HR-MAS RMN), que permite la estimación de la concentración de diversos metabolitos en tejido nervioso intacto, sin la necesidad de disgregar el tejido. Este análisis metabolómico se realizó en muestras de corteza e hipocampo de animales APP/PS1 y WT de 6 y 12 meses de edad, con el fin de determinar posibles diferencias en cuanto a la concentración de metabolitos debidas al genotipo o a la edad.

Una vez que se obtuvieron los datos de concentración de metabolitos, se realizó un agrupamiento general de las muestras teniendo en cuenta todos los metabolitos de forma conjunta. Tras realizar comparaciones por pares mediante la correlación de Spearman, las muestras fueron agrupadas según su nivel de similitud en *heatmaps* de corteza (Fig. 3.20 A), de hipocampo (Fig. 3.20 B) y de ambas regiones conjuntamente (Fig. 3.21). No se observó que las muestras de animales APP/PS1 tuvieran mayor similitud entre sí que con las de los animales control WT de la misma edad, ya que existía una gran variabilidad interindividual dentro de cada grupo. Además, se analizaron por separado las concentraciones obtenidas para los distintos metabolitos. Concretamente, nos centramos en moléculas clave en la producción de energía, como la fosfo-creatina (Fig. 3.22 A-B) y el lactato (Fig. 3.22 C-D), y en la protección antioxidante, como el glutatión (Fig. 3.22 E-F). No se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos genotipos y edades para ninguno de estos metabolitos. No obstante, por la variabilidad entre individuos y las limitaciones de la técnica, no se descarta que puedan existir cambios que no han sido detectados en este estudio. Es posible que la patología ya existente a 6 meses esté lo suficientemente avanzada que imposibilite detectar cambios significativos a los 12 meses.

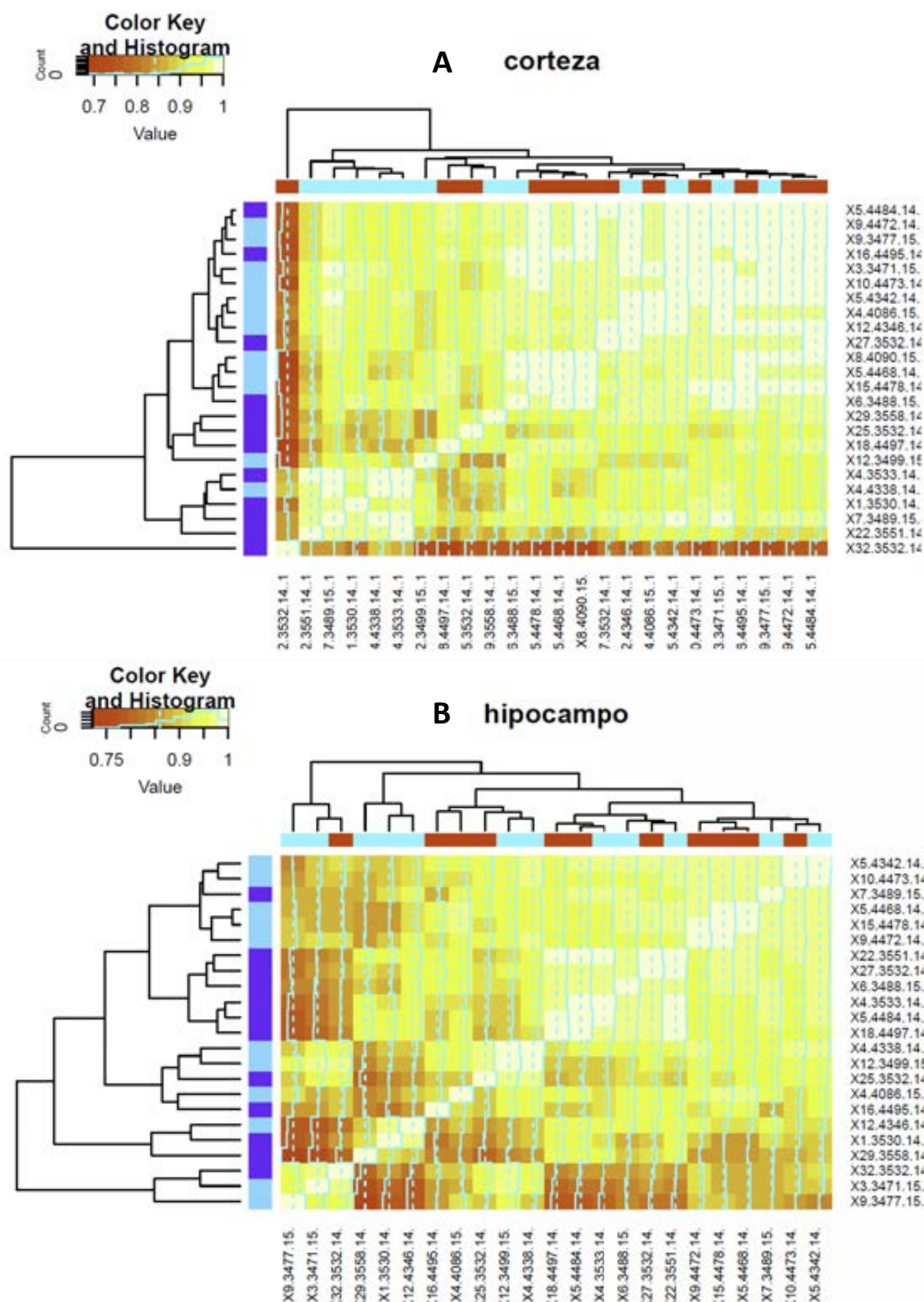


Figura 3.20. Estudio metabolómico I. Agrupamiento global de las muestras de corteza (A) e hipocampo (B) (*heatmap*) según los valores de todos los metabolitos, realizando la correlación de Spearman entre cada par de muestras. La barra vertical indica el genotipo (azul claro: WT, azul oscuro: APP/PS1), y la barra horizontal se refiere a la edad de los animales (rojo: 6 meses, azul claro: 12 meses).

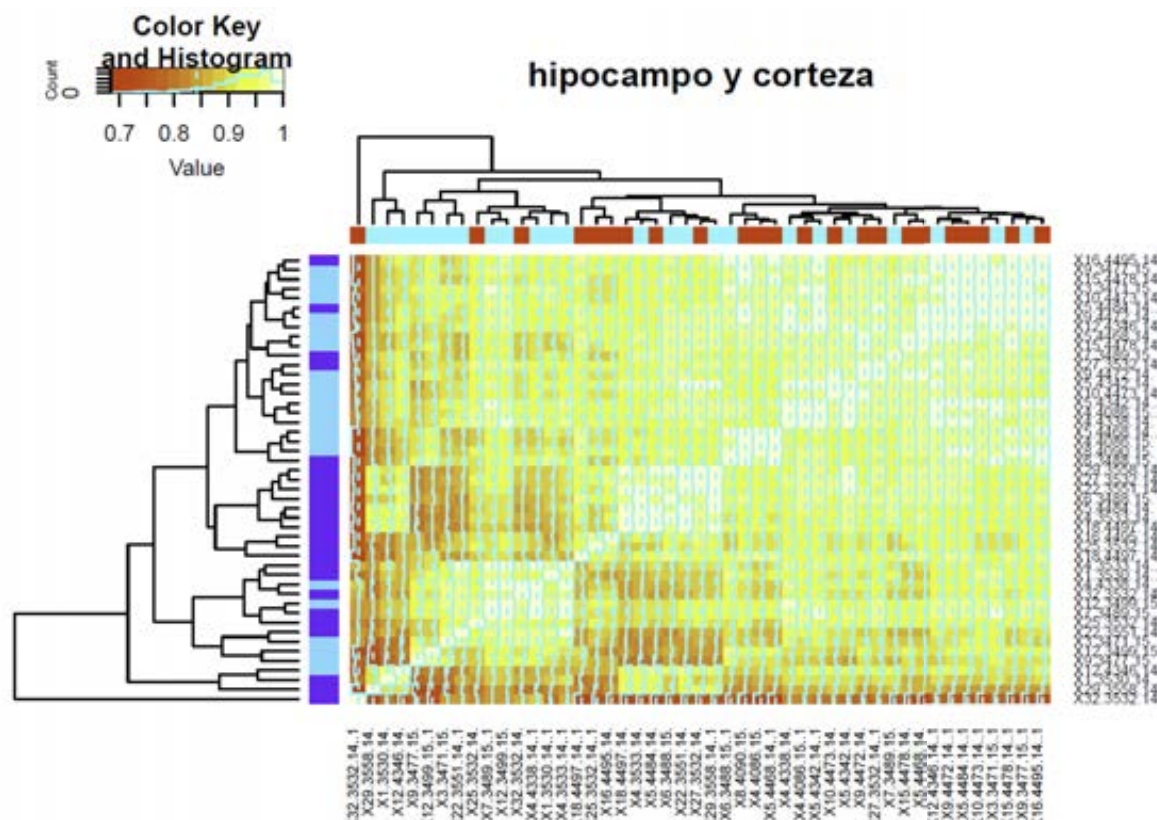


Figura 3.21. Estudio metabolómico II. Agrupamiento global de las muestras de corteza e hipocampo de forma conjunta (*heatmap*) según los valores de todos los metabolitos, realizando la correlación de Spearman entre cada par de muestras. La barra vertical indica el genotipo (azul claro: WT, azul oscuro: APP/PS1), y la barra horizontal se refiere a la edad de los animales (rojo: 6 meses, azul claro: 12 meses).

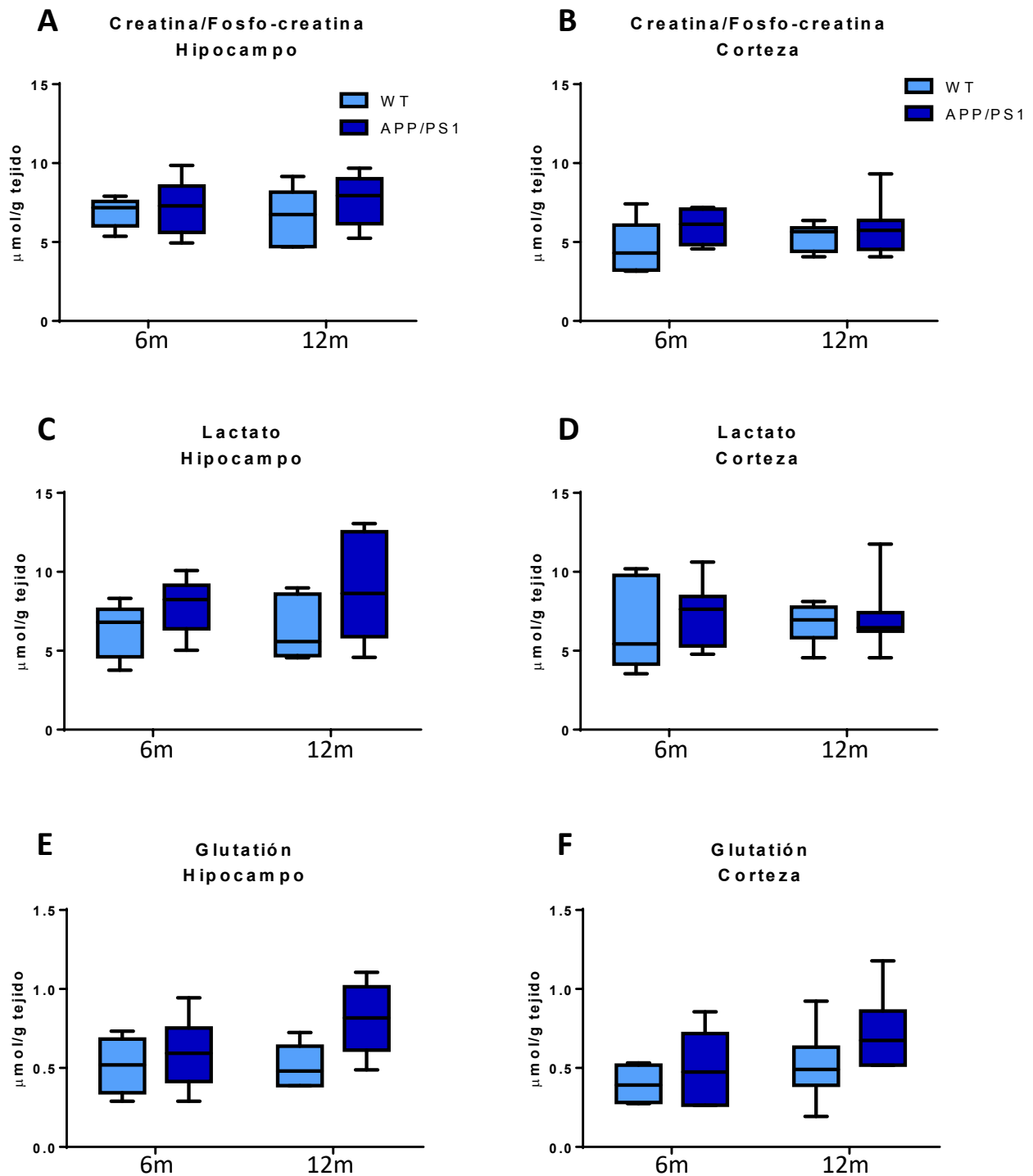


Figura 3.22. No existen cambios significativos en las concentraciones de metabolitos relacionados con la producción de energía y la protección antioxidante en función del genotipo (APP/PS1 y WT) o la edad (6 y 12 meses) de los animales. Entre los metabolitos analizados en este estudio, realizado en la corteza y el hipocampo de animales silvestres y transgénicos APP/PS1, se encontraban la creatina/fosfo-creatina (A-B), el lactato (C-D) y el glutatión (E-F). Los datos representados en cajas corresponden a los percentiles 25, 50 y 75. N=6/grupo; prueba de Kruskal/Wallis, no significativo.

3.2. RELACIÓN ENTRE LAS PLACAS AMILOIDES Y LA MICROGLÍA DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA EN EL MODELO APP/PS1

Tanto en pacientes de Alzheimer como en modelos animales, la patología amiloide va acompañada por un proceso de activación microglial. Diversos genes microgliales están asociados con el riesgo de padecer la enfermedad, sin embargo, aún se desconoce la función de estas células en el proceso patológico. Nuestro grupo ha descrito recientemente que en el hipocampo de los pacientes ocurre un proceso de degeneración microglial (Sanchez-Mejias et al. 2016), hecho que no es replicado por los modelos amiloidogénicos. Sin embargo, no se conoce si en estos modelos las propiedades de la microglía que rodea a las placas cambian durante la progresión de la patología afectando a la toxicidad de las placas amiloides. En base a todo lo expuesto, en este capítulo de resultados se ha profundizado en la caracterización de las propiedades y las funciones de la microglía periplaca en el modelo APP/PS1 desde los 4 a los 18 meses de edad. Para ello, se han empleado estudios transcriptómicos, técnicas inmunohistoquímicas a microscopía de campo claro, estudios de microscopía confocal, análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión y técnicas de análisis de imagen.

3.2.1. LA RESPUESTA MICROGLIAL PROGRESA EN PARALELO CON LA PATOLOGÍA AMILOIDE HASTA LOS 12 MESES, EDAD A PARTIR DE LA CUAL EXISTE UN FRENO EN LA REACTIVIDAD MICROGLIAL

En el modelo amiloidogénico APP/PS1 ocurre una estrecha asociación entre la aparición de las placas amiloides y la activación microglial, estando todas las placas rodeadas de una corona de microglía activada o asociada a patología. En un primer análisis general hemos utilizado el marcador microglial Iba1 (marca microglía homeostática interplaca y microglía activada alrededor de las placas) junto con diversos marcadores de A β . Iba1 también es un marcador de macrófagos, no obstante, éstos son minoritarios en el cerebro de ratón y además no son parenquimales (macrófagos perivasculares, menígeos y de los plexos coroideos), por lo que Iba1 es ampliamente utilizado como marcador microglial. Mediante inmunomarcaje doble a microscopía confocal para 4G8 (A β , placas amiloides) e Iba1 (microglía), es evidente que el aumento con la edad en la cantidad de placas amiloides en el hipocampo va acompañado de un incremento en la cantidad de marca Iba1-positiva asociada a las placas (Fig. 3.23). En las imágenes panorámicas del hipocampo de animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad se puede apreciar que este aumento para ambos marcadores ocurre de forma generalizada en las distintas regiones hipocampales (CA, subículo y giro dentado). La microglía activada rodea a las placas amiloides del modelo formando un anillo (corona microglial). En la figura 3.24 se muestra a mayores aumentos la íntima relación entre las placas amiloides y la microglía mediante inmunofluorescencia doble 4G8/Iba1 a microscopía confocal. La microglía que rodea las placas se encuentra activada, proceso que se caracteriza por profundos cambios morfológicos y moleculares. Los cambios morfológicos incluyen una hipertrofia del cuerpo celular junto con un acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones (ver Fig. 3.24 F-H). A nivel molecular, la microglía activada también se caracteriza por una firma molecular específica (CD45, CD68, TREM2, entre otros), que es

diferente a la de la microglía homeostática interplaca (que expresa por ejemplo CX3CR1, P2RY12 y TMEM119), lo cual permite una clara diferenciación de ambas poblaciones. En la región estudiada en este trabajo, el hipocampo, todas las placas amiloides están rodeadas por microglía activada, sus cuerpos celulares se encuentran dentro de la región del halo (periferia) y sus prolongaciones se dirigen hacia el core de la placa (Fig. 3.24 A-C). Al emplear el marcador Iba1 combinado con tinción con Tioflavina-S, que marca exclusivamente el core fibrilar de las placas, se aprecia que las prolongaciones microgliales se introducen en el core de las placas amiloides y, además, lo rodean (Fig. 3.24. D-E). Es destacable que se determinaron, a nivel cualitativo, diferencias en la envoltura microglial en función del tamaño de las placas amiloides, estando las placas de tamaño pequeño aparentemente más recubiertas por microglía que las placas de gran tamaño.

Esta estrecha relación entre la microglía activada y las placas amiloides en nuestro modelo transgénico APP/PS1 se ha estudiado también en este trabajo mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). A nivel ultraestructural, la microglía se caracteriza por tener una electrodensidad variable (de moderada a muy electrodensa), distinguiéndose de los astrocitos, cuyo citoplasma es muy poco electrodenso y además presentan gran cantidad de filamentos intermedios en el citoplasma de las prolongaciones. Las placas amiloides tienen un aspecto fibrilar y electrodensa a microscopía electrónica de transmisión. Las placas de pequeño tamaño presentaban células microgliales situadas muy cerca del core, envolviéndolo (Fig. 3.25 A). Las placas de gran tamaño estaban rodeadas por varias células microgliales, y los cuerpos se encontraban más alejados del core. Las placas grandes además presentaban un gran número de distrofias neuronales a su alrededor (Fig. 3.25 B). Mediante marcaje inmuno-oro para MET empleando anti-Iba1 (Fig. 3.26) se confirmó que estas células asociadas a las placas amiloides eran de naturaleza microglial (positivas para Iba1), observándose la marca tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones, y estando principalmente asociada a la membrana, aunque también en el citoplasma y, en menor medida, en el núcleo (en la eucromatina). Además, de forma frecuente, la microglía asociada a placas presentaba en su citoplasma cuerpos fagocíticos con material electrodensa. En general, el citoplasma microglial era menos electrodensa que las fibras amiloides de la placa, lo que permitía diferenciar ambas estructuras entre sí, incluso cuando no se utilizó inmunomarcaje para microglía. A mayores aumentos, en las imágenes a MET se observó que las prolongaciones microgliales Iba1-positivas se entrelazaban estrechamente con las fibras amiloides y las rodeaban (Fig. 3.27). Las placas también se encuentran rodeadas por astrocitos reactivos (Fig. 3.28), tal y como se ilustra mediante inmuno-oro para EAAT2 (proteína transportadora de glutamato, del inglés *excitatory amino-acid transporter 2*), un marcador específico de células astrogiales y que se localiza asociado a la membrana plasmática. Los cuerpos celulares de los astrocitos reactivos generalmente se encuentran más alejados del core de las placas que la microglía (Fig. 3.28 A). A mayores aumentos (Fig. 3.28 A1), se muestra cómo las prolongaciones astrogiales marcadas con EAAT2 se dirigen también hacia la placa amiloide y la rodean entremezclándose con las prolongaciones microgliales. Mediante marcaje fluorescente triple para las placas amiloides (4G8), la microglía (Iba1) y la astrogía (GFAP, proteína glial fibrilar ácida) (Fig. 3.28 B), se muestra la relación entre las placas amiloides y los dos tipos de células gliales. Las placas están rodeadas por ambos tipos de células gliales, estando la microglía más cerca del core y sus

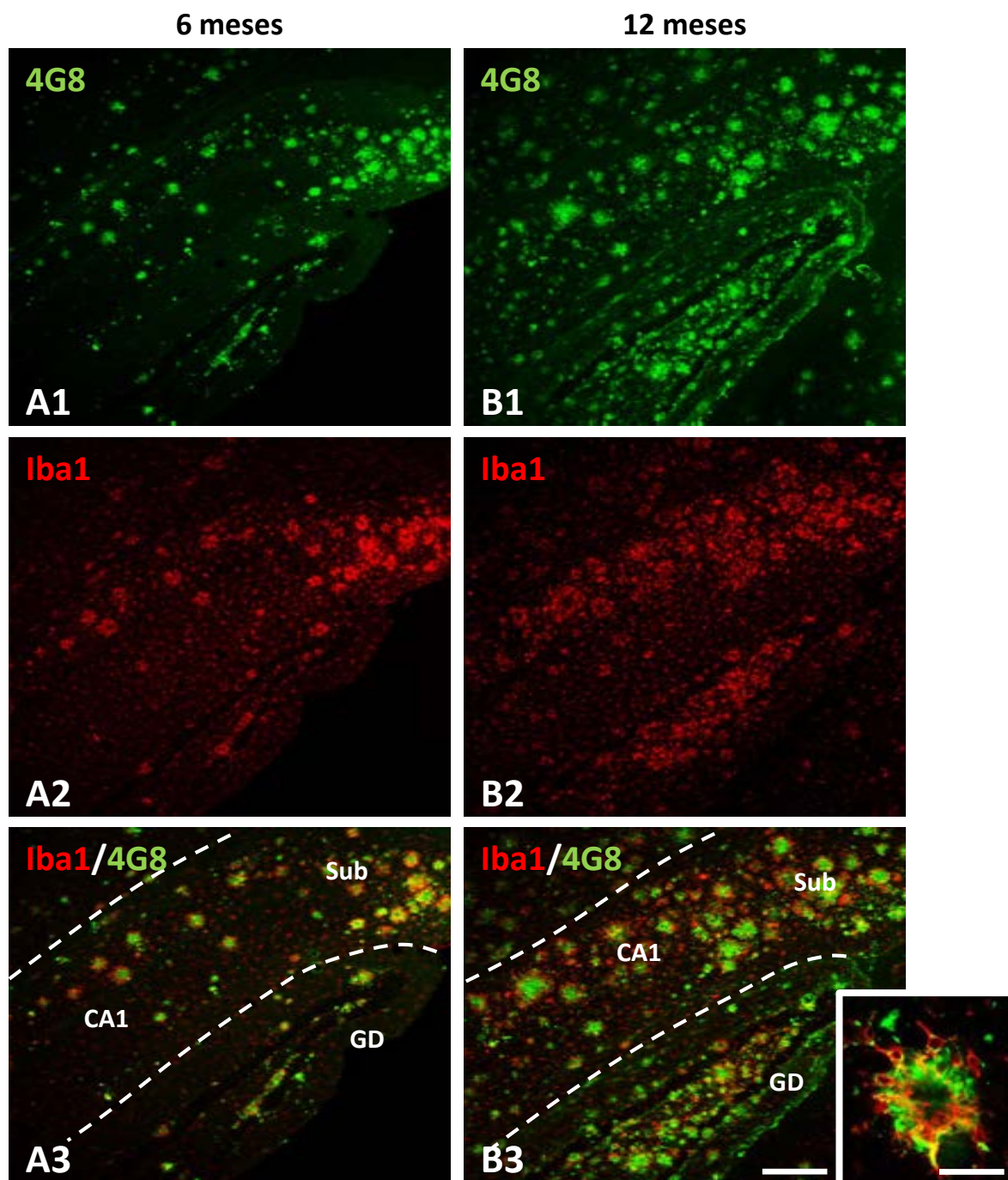


Figura 3.23. La patología amiloide induce en paralelo una fuerte activación microglial en el hipocampo del modelo APP/PS1. Inmunofluorescencia doble para A β (4G8; en verde) y microglía (anti-Iba1; en rojo) a microscopía confocal. Imágenes representativas del hipocampo de APP/PS1 a 6 (A1-A3) y 12 (B1-B3) meses de edad. Las placas amiloides presentan a su alrededor una corona microglial (ver inserto en B3 para mayor detalle). CA1: asta de Ammon 1, GD: giro dentado, Sub: subículo. Barra de escala: 200 μ m (A1-A3 y B1-B3) y 20 μ m (detalle en B3).

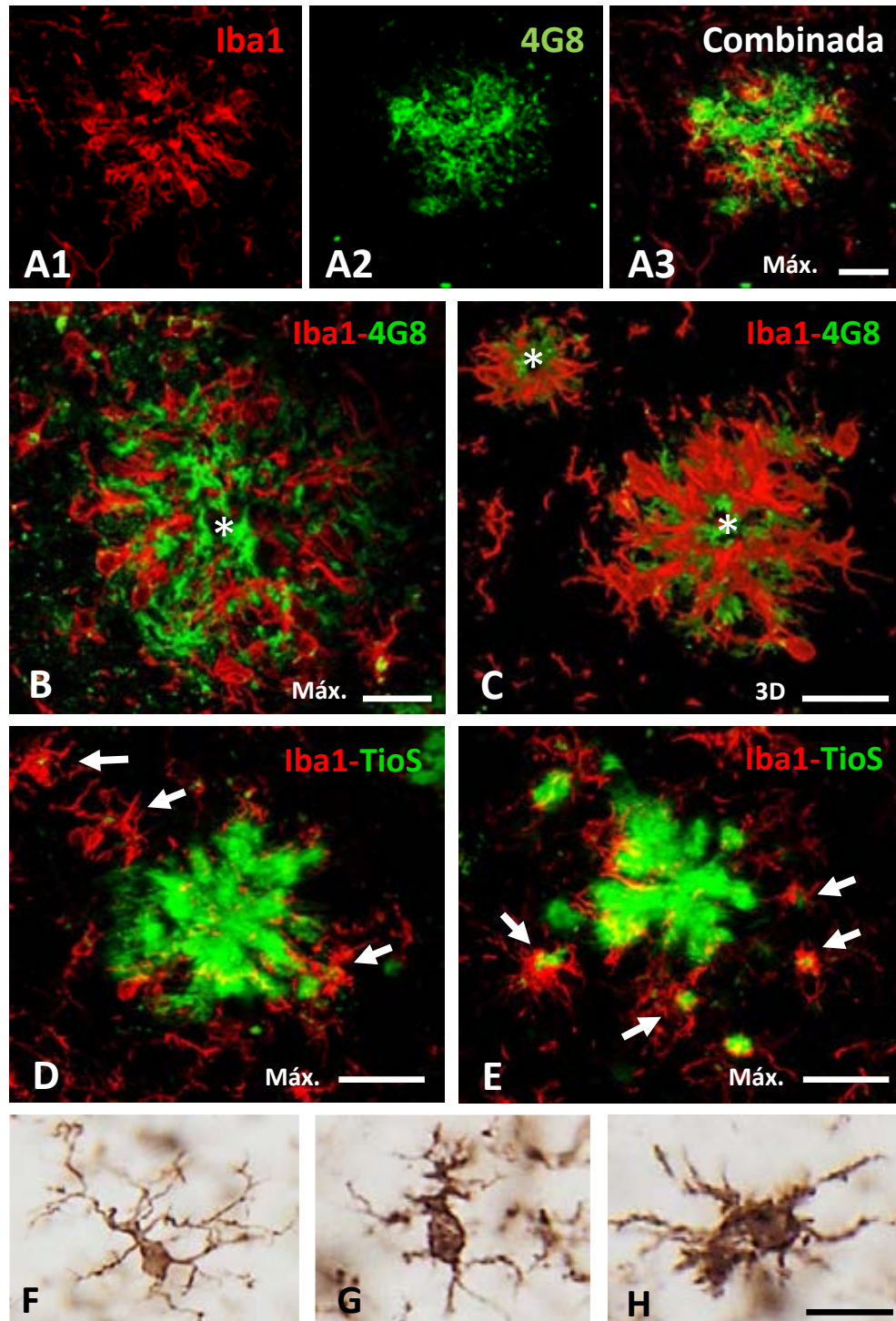


Figura 3.24. Las placas amiloides presentan una envoltura heterogénea de microglía activada. A-E, doble marcaje fluorescente para microglía con anti-Iba1 (rojo) y A β con 4G8 (verde; A-C) o Tioflavina-S (verde; D y E). Microscopía láser confocal, proyecciones máximas (Máx.: A-B, D-E) y reconstrucción en volumen (3D: C) a partir de imágenes en Z-stacks. Todas las placas amiloides están rodeadas por microglía Iba1-positiva. Las prolongaciones microgliales se introducen el core (asterisco) de la placa (A-C). Las placas pequeñas presentan mayor envoltura microglial (flechas en D y E) que las placas más grandes comparativamente. F-H, inmunohistoquímica para Iba1 a microscopía de campo claro mostrando células microgliales con morfología homeostática (F) y activada (G y H). Barras de escala: 20 μ m (A-H).

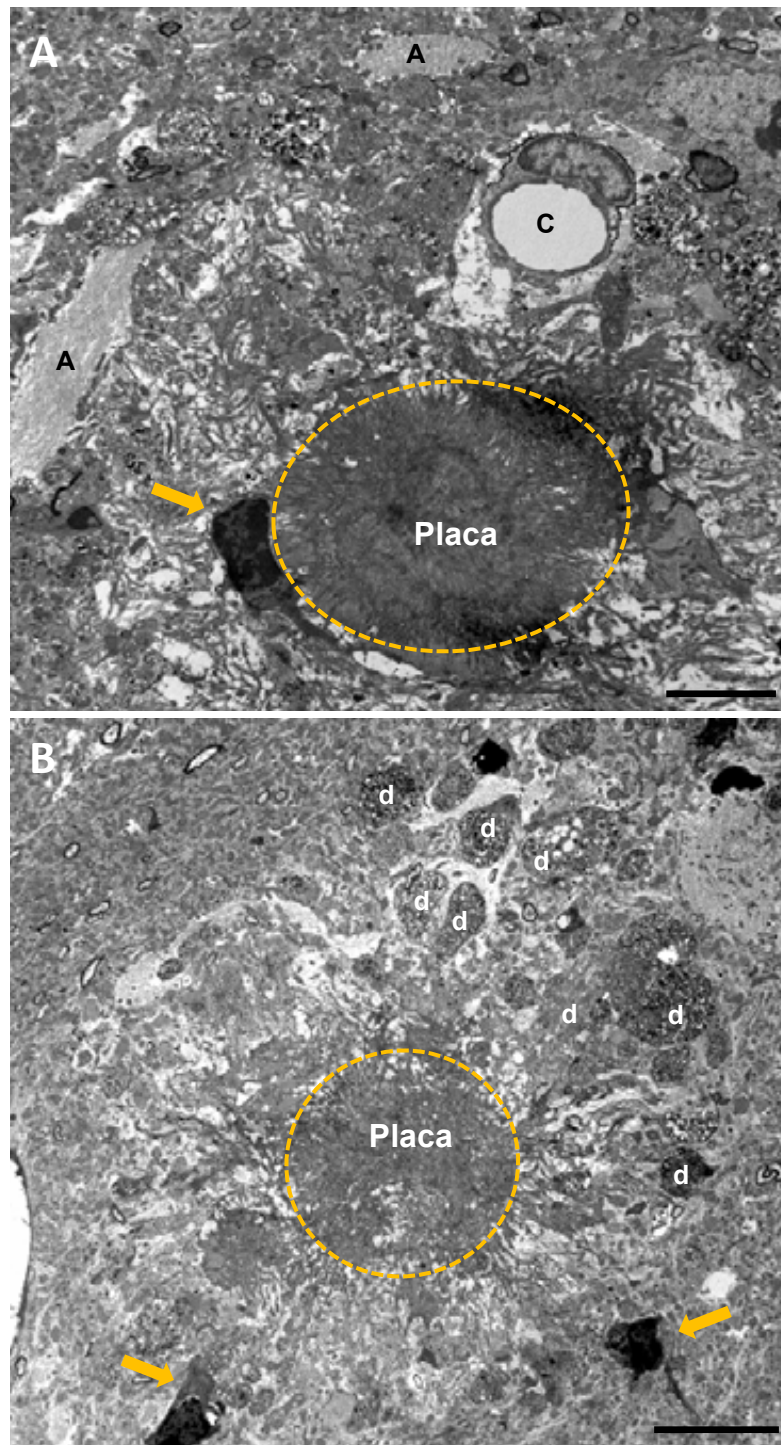


Figura 3.25. Imágenes a microscopía electrónica de transmisión de placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1. **A**, placa pequeña con una célula microglial (flecha amarilla) adosada al core (delimitado por línea discontinua). **B**, placa amiloide de mayor tamaño rodeada de neuritas distróficas (d) y células microgliales (flechas amarillas) alejadas del core (línea discontinua amarilla). A: astrocito, C: capilar sanguíneo. Barras de escala: 5 μ m (A) y 10 μ m (B).

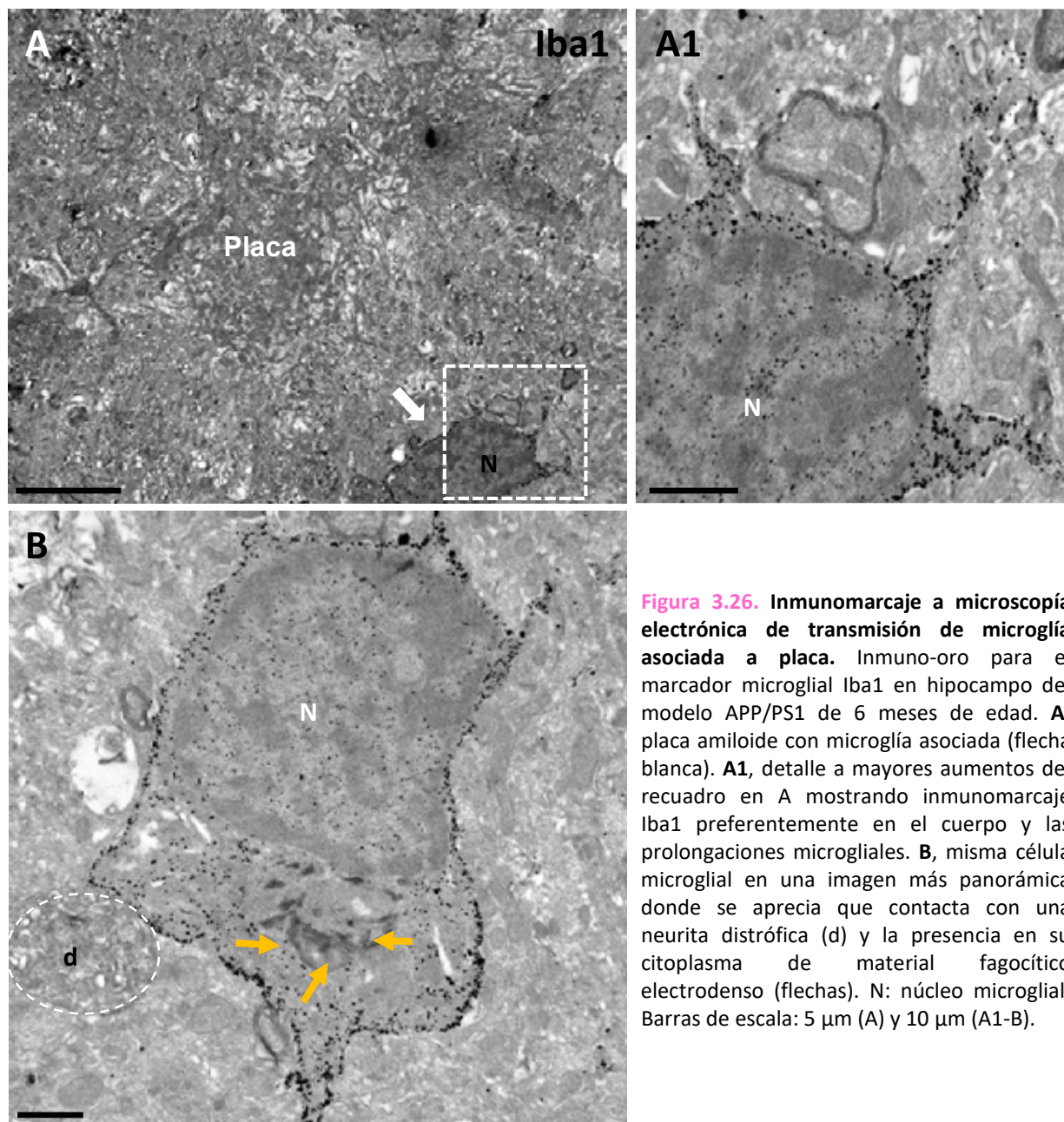


Figura 3.26. Inmunomarcaje a microscopía electrónica de transmisión de microglía asociada a placa. Inmuno-oro para el marcador microglial Iba1 en hipocampo del modelo APP/PS1 de 6 meses de edad. **A**, placa amiloide con microglía asociada (flecha blanca). **A1**, detalle a mayores aumentos del recuadro en A mostrando inmunomarcaje Iba1 preferentemente en el cuerpo y las prolongaciones microgliales. **B**, misma célula microglial en una imagen más panorámica donde se aprecia que contacta con una neurita distrófica (d) y la presencia en su citoplasma de material fagocítico electrodenso (flechas). N: núcleo microglial. Barras de escala: 5 μm (A) y 10 μm (A1-B).

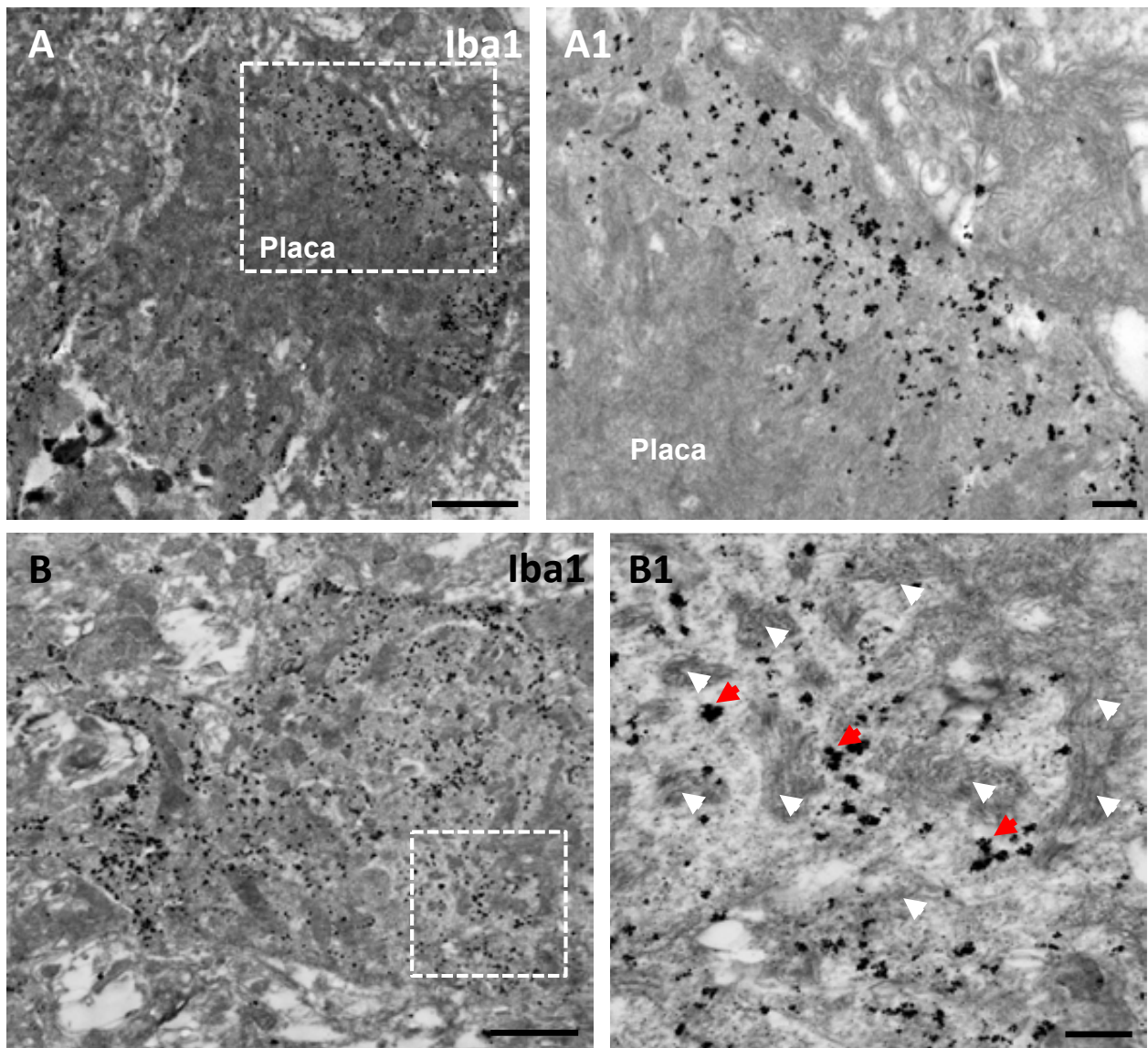


Figura 3.27. Relación microglía-placa a nivel ultraestructural. Inmuno-oro para Iba1 a microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de APP/PS1 de 6 meses de edad. Las prolongaciones microgliales rodean y se interdigitan estrechamente con los haces de fibras amiloides de la placa. **A**, imagen panorámica de una placa amiloide; **A1**, imagen a mayores aumentos de la región recuadrada en A mostrando el recubrimiento microglial (citoplasma microglial inmunomarcado); **B**, región de una placa amiloide con marcaje para Iba1; **B1**, detalle de la región recuadrada en B mostrando la estrecha asociación del citoplasma microglial (inmunomarcaje señalado con flechas rojas) y las fibras amiloides (de mayor electrodensidad y señaladas con puntas de flecha blancas). Barras de escala: 1 μm (A-B) y 0,2 μm (A1-B1).

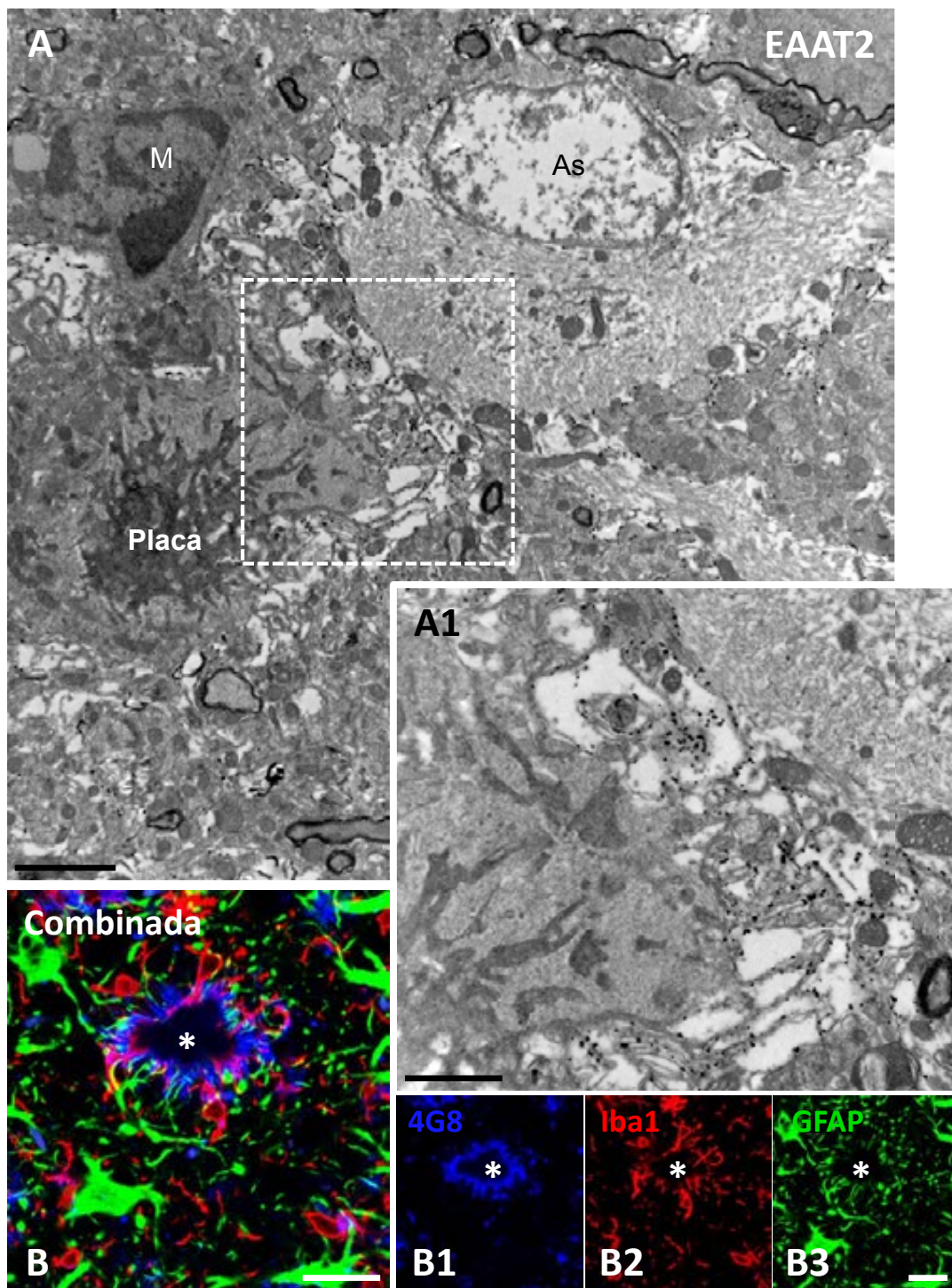


Figura 3.28. Identificación ultraestructural de prolongaciones astrogliales alrededor de las placas amiloides. Inmuno-oro para el marcador astrogliar EAAT2 en hipocampo de APP/PS1 de 6 meses de edad (A y A1). **A**, imagen panorámica de una placa rodeada de microglía (M) y astrogliá (As); **A1**, detalle de la región recuadrada en A mostrando prolongaciones astrogliales (de baja electrodensidad e inmunomarcadas); **B**, triple marcaje inmunofluorescente para GFAP (astrogliá en verde), Iba1 (microglía en rojo) y 4G8 (A β en azul) a microscopía confocal; **B1-B3** muestran los diferentes marcajes por separado. Asterisco indica el core de la placa. Barras de escala: 25 μ m (B y B1-3), 2 μ m (A) y 1 μ m (A1).

prolongaciones entrelazadas más estrechamente con el mismo que las prolongaciones de los astrocitos reactivos.

Tras esta caracterización inicial de la relación microglía-placa a nivel celular y subcelular, nuestro objetivo principal fue analizar la progresión de la activación microglial en el hipocampo del modelo APP/PS1 con el avance de la patología amiloide. Uno de los marcadores más ampliamente utilizados para estudiar la activación microglial es CD45, un receptor de membrana que se sobreexpresa cuando estas células se activan. Aunque en el cerebro marca principalmente la microglía activa, también es un marcador de macrófagos y linfocitos activados. Mediante inmunomarcaje a campo claro con anti-CD45 en animales de 4, 6, 12 y 18 meses (**Fig. 3.29 A-D**), se analizó la progresión de la activación microglial con la edad en el hipocampo del modelo APP/PS1. Cualitativamente, se observó un claro aumento de la activación microglial con la progresión de la patología. A mayor detalle (ver inserto en **Fig. 3.29 A1**), se muestra que esta activación microglial ocurre alrededor de las placas amiloides. Para confirmar si estos cambios eran significativos, se analizó la carga microglial para CD45 en la región CA1 del hipocampo mediante análisis de imagen (**Fig. 3.29 E**), es decir, se midió y calculó el porcentaje de área CD45-inmunopositiva con respecto al área total de la región. Se obtuvo que el área CD45-positiva era significativamente menor a 4 meses ($F(3,8)=16,03$, $P=0,001$), produciéndose un gran aumento entre los 4 y los 6 meses ($3,69\pm0,58$ veces, $p<0,01$). A partir de los 6 meses la activación microglial alcanzaba su máximo, produciéndose una ligera disminución (no significativa) a los 18 meses. Al comparar la evolución con la edad de la patología amiloide (**ver Fig. 3.30**) y la activación microglial (**Fig. 3.29 F**) en los mismos ejemplares, se observó que entre los 4 y los 12 meses, las áreas ocupadas por las placas amiloides (OC-positivas) y la microglía activada (CD45-positiva) tendían a aumentar. Sin embargo, entre los 12 y los 18 meses, la patología amiloide seguía incrementándose mientras que la activación microglial no aumentaba o incluso disminuía ligeramente. Se comprobó que, efectivamente, entre los 4 y los 12 meses existía correlación positiva entre la patología amiloide (área OC-positiva) y la activación microglial (área CD45-positiva) (**Fig. 3.29 G**). Cuanto mayor era el área positiva para OC, mayor era el área CD45-positiva ($r=0,92$, $P=0,0005$), indicando una clara relación entre la patología amiloide y la microglía activada alrededor de las placas. El estudio con el marcador OC (anti-A β oligomérico prefibrilar) se muestra en la **figura 3.30**, y se pone de manifiesto que a 18 meses la carga amiloide era significativamente mayor que al resto de edades ($F(3,8)=26,37$, $P=0,0002$), aumentando $15,45\pm4,22$ veces entre los 4 y los 18 meses ($p<0,001$).

Hemos corroborado en nuestro modelo APP/PS1 que CD45 era específico para marcar la microglía activada alrededor de las placas (**Fig. 3.31**). Se comprobó que, efectivamente, CD45 es un marcador de activación microglial, no observándose inmunorreactividad no asociada a placas (con excepción de los macrófagos perivasculares y algunos linfocitos infiltrados a edades avanzadas que expresan altos niveles de CD45), mientras que Iba1 se expresa tanto en la microglía periplaca como en la interplaca. Alrededor de las placas, aunque ambos marcadores se unen específicamente a la membrana del cuerpo celular microglial (detalle de colocalización en **Fig. 3.31C**), el marcaje en las prolongaciones varía entre estos dos marcadores. Iba1 marca las prolongaciones principales (más próximas al cuerpo) de la microglía, mientras que CD45 marca tanto prolongaciones primarias como las prolongaciones

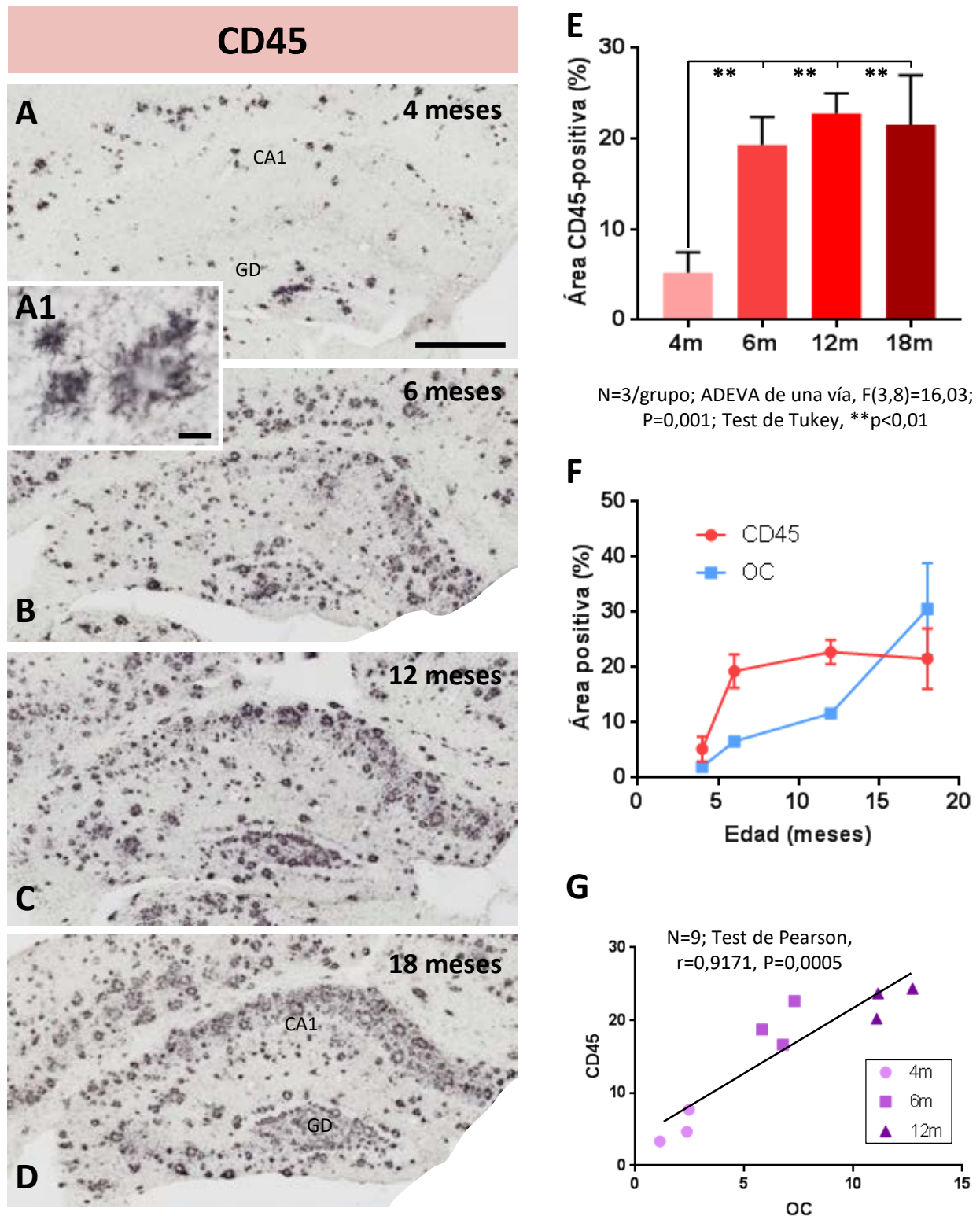


Figura 3.29. La microglía activada incrementa progresivamente con la patología amiloide. A-D, Inmunohistoquímica a campo claro para CD45 (marcador de microglía activada) en el hipocampo de APP/PS1 de 4 (A, detalle en inserto A1), 6 (B), 12 (C) y 18 (D) meses de edad. E, estudio cuantitativo del área inmunorreactiva para CD45 (carga microglía activada) en la región CA1. F, análisis comparativo de la progresión de la activación microglial y la patología amiloide (OC: A β oligomérico). G, correlación entre la carga microglial y la carga amiloide. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. Estadística y significancia indicadas en las gráficas. CA1: asta de Ammon 1, GD: giro dentado. Barras de escala: 500 μ m (A-D) y 20 μ m (A1).

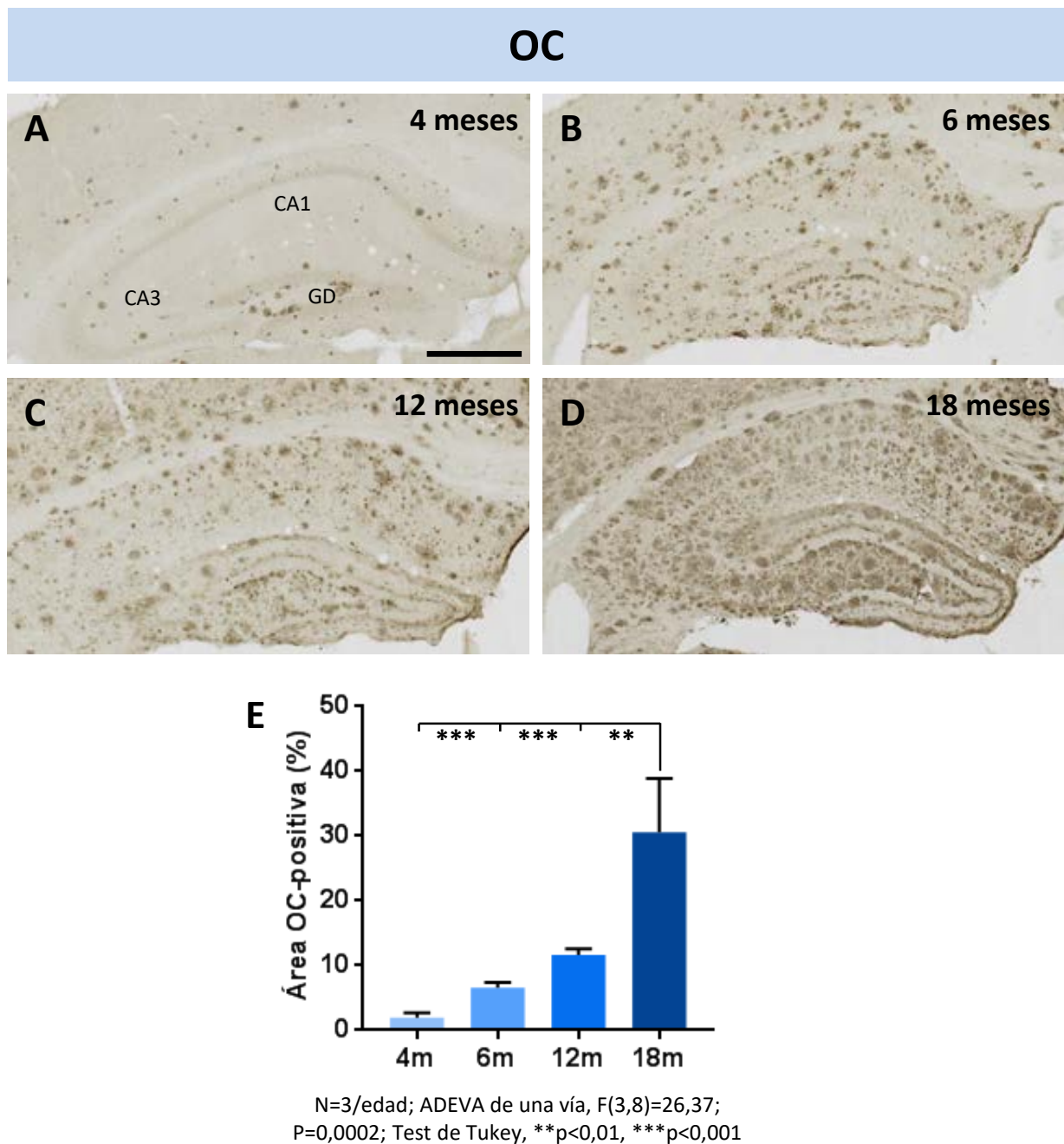


Figura 3.30. La acumulación de A β oligomérico en el hipocampo del modelo APP/PS1 incrementa de forma gradual y significativa con la edad. A-D, inmunohistoquímica a campo claro para A β oligomérico (anticuerpo OC) a 4 (A), 6 (B), 12 (C) y 18 (D) meses de edad. El aumento con la edad en el número de depósitos inmunorreactivos es notable. E, estudio cuantitativo de la progresión temporal en la carga de A β oligomérico en la región de CA1. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. Estadística y significancia indicadas en la gráfica. CA1 y CA3: regiones 1 y 3 del asta de Ammon, GD: giro dentado. Barra de escala: 500 μ m.

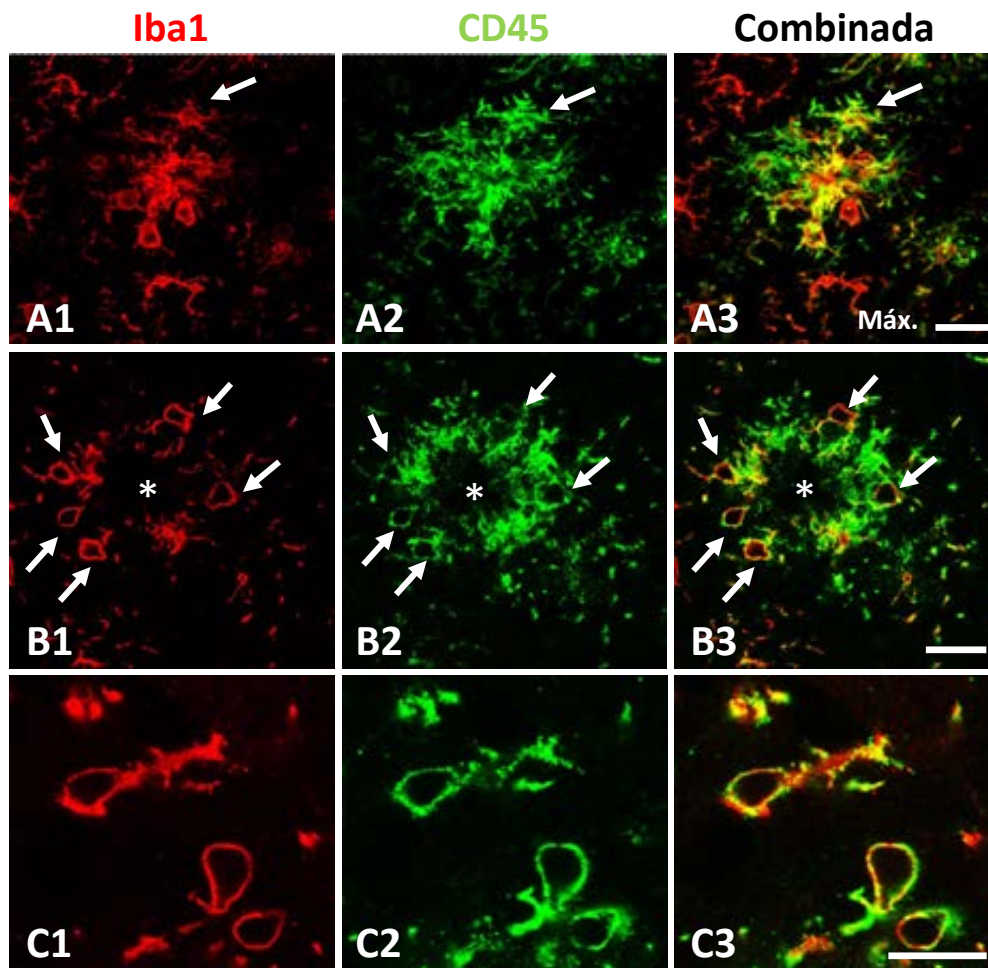


Figura 3.31. Las células microgliales activadas que rodean las placas son inmunopositivas para CD45. Inmunofluorescencia doble para Iba1 (rojo; A1-C1) y CD45 (verde; B1-B3) en el hipocampo de APP/PS1 a microscopía confocal. Como se aprecia en las imágenes combinadas (A3-C3) la microglía Iba1-positiva activada expresa el marcador de activación CD45; las flechas indican algunas células microgliales, y el asterisco indica el core de una placa amiloide. C1-C3, las imágenes muestran la localización preferente de ambos marcadores a nivel de membrana. Barras de escala: 20 μ m (A1-A3 y B1-B3) y 10 μ m (C1-C3).

más finas, observándose una elevada expresión de CD45 en las prolongaciones que se dirigen hacia el core de las placas. A microscopía electrónica de transmisión, empleando inmunomarcaje con oro coloidal para CD45 en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 y 12 meses (Fig. 3.32), también se corroboró que la microglía que se encuentra en íntimo contacto con las placas amiloides está activada, presentando marca CD45-positiva principalmente asociada a la membrana plasmática. A grandes aumentos, se aprecia que las prolongaciones de la microglía activada, marcadas con partículas de oro y menos electrodensas, se entrelazan estrechamente con las fibras amiloides de las placas.

3.2.2. CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA DE LA MICROGLÍA ACTIVADA

Para una caracterización más detallada de la activación microglial en el modelo amiloidogénico, se realizó un análisis transcriptómico de la microglía activada aislada de la corteza e hipocampo de animales APP de 3 (escasa patología amiloide) y 12 (elevada patología amiloide) meses. Para el aislamiento de la microglía activada, se empleó el marcador Clec7a (del inglés, *C-type lectin domain family member A*), un receptor de membrana que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y es necesario para la respuesta inflamatoria mediada por TLR2. La expresión diferencial del marcador Clec7a entre la microglía activada (alta expresión) y no activada (baja expresión), permitió separar estas subpoblaciones microgliales mediante citometría. Tras la extracción del ARN de la microglía aislada, se analizó mediante arrays y el método GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) la expresión de miles de genes microgliales, tanto asociados al fenotipo DAM (microglía asociada a enfermedad) como homeostáticos, algunos de los cuales se muestran en la figura 3.33. Se observó un claro aumento con la edad en la expresión de genes DAM, como *CD68*, *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP* y *APOE* (Fig. 3.33 A1). Por el contrario, los genes homeostáticos microgliales, como *CSF1R*, *CX3CR1*, *P2RY12* y *TMEM119* entre otros, tenían unos mayores niveles de expresión en la microglía de animales jóvenes (Fig. 3.33 A2). Aunque la función de muchos de los genes analizados es conocida, también se encontraron diferencias en genes cuya función aún no se ha descrito. Al analizar cuantitativamente la expresión relativa de algunos de estos genes DAM a 12 meses con respecto a 3 meses (Fig. 3.33 B), se obtuvieron aumentos de entre 10 y 10⁹ veces (representado en la gráfica como Log₁₀ *fold change*). Algunos de los genes cuya expresión aumentaba de forma más acusada (en torno a 10⁸ veces) fueron *CLEC7A*, *IGF1*, *CST7*, *AXL*, *SPP1* y *APOE*. El gen *IGF1* (*insulin-like growth factor*) codifica para una proteína estructural y funcionalmente similar a la insulina, estando implicada en la regulación del transporte de glucosa. *CST7* codifica para la cistatina-F, que se expresa en células del sistema inmune y es un inhibidor de proteasas como la cathepsina C. *AXL* codifica para un receptor de membrana tirosina-quinasa implicado en la supervivencia celular, la proliferación, la migración y la diferenciación, participando además en la inhibición de receptores TLR. *SPP1* codifica para la osteopontina, la cual es un componente fundamental de la matriz extracelular que además actúa como citoquina estimulando la producción de IFN γ e IL-12 y reduciendo la producción de IL-10 (fenotipo microglial proinflamatorio). *APOE*, aunque se expresa principalmente en los astrocitos, también se expresa en la microglía y participa en la activación DAM.

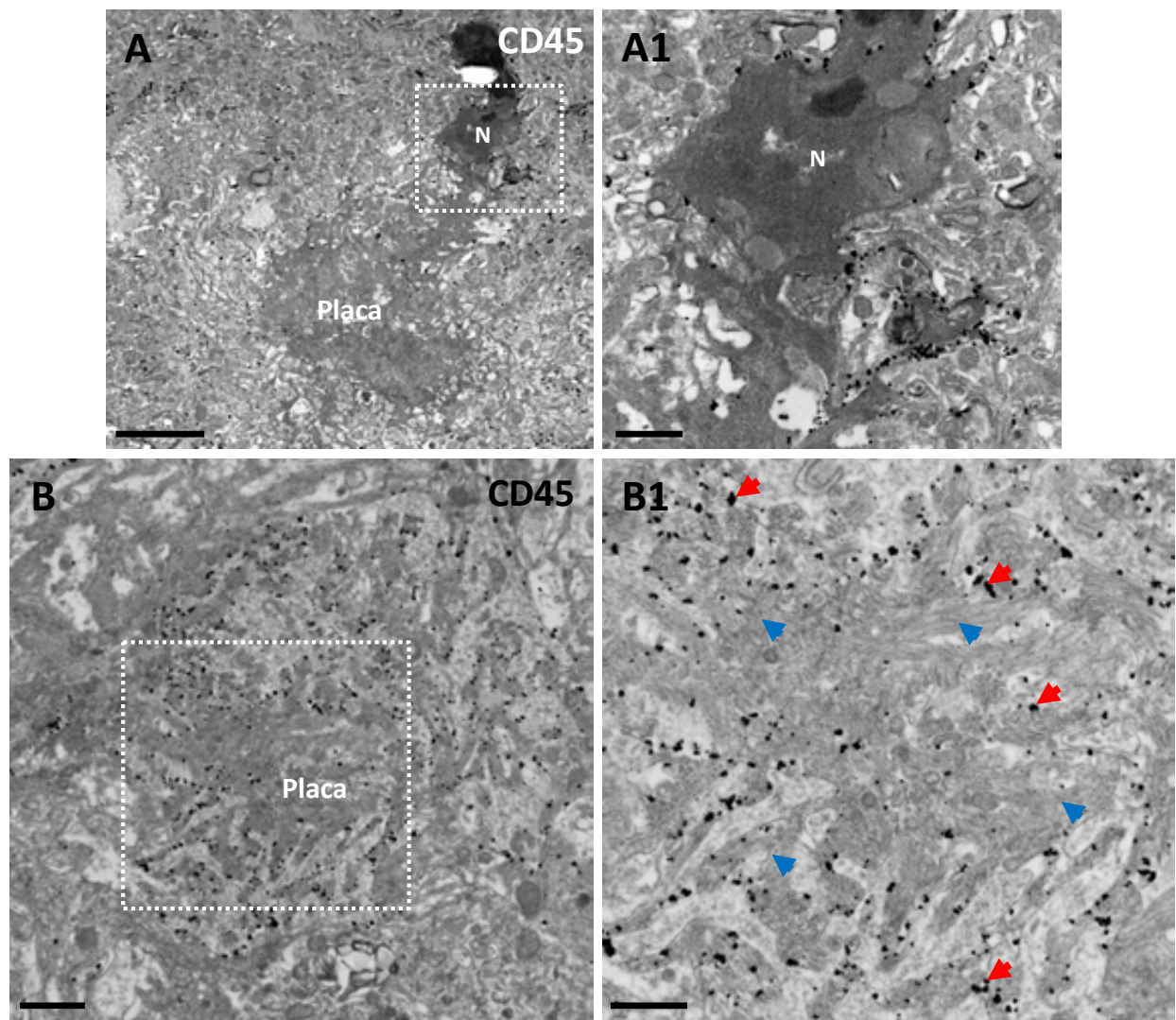
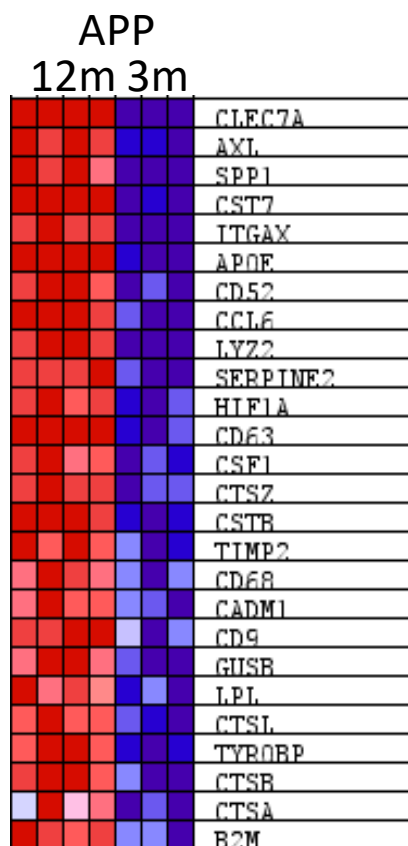
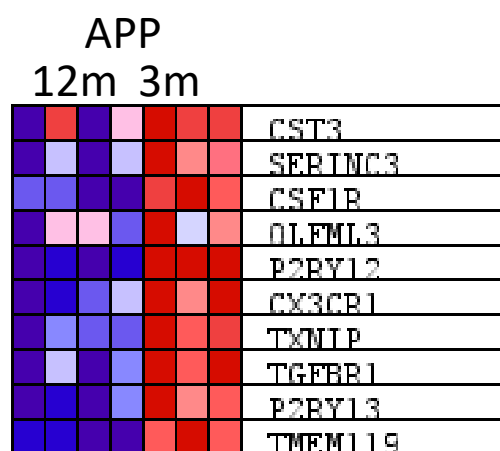


Figura 3.32. Visualización ultraestructural de la microglía activada marcada con anti-CD45. Inmuno-oro para CD45 a microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de animales APP/PS1 de 6 (A) y 12 meses (B). **A**, imagen panorámica de una placa amiloide con microglía activada CD45-positiva; **A1**, detalle a mayores aumentos de la célula microglial recuadrada en A mostrando inmunomarcaje periférico a nivel de membrana; **B**, imagen de la región de una placa con prolongaciones microgliales inmunorreactivas; **B1**, detalle de la región recuadrada en B donde se puede apreciar la estrecha interdigitación de las prolongaciones microgliales CD45-positivas (partículas de oro indicadas con flechas rojas) y las fibras amiloides (indicadas con puntas de flecha azules). N: núcleo microglial. Barras de escala: 5 μm (A), 1 μm (A1 y B) y 0,5 μm (B1).

A1 DAM



A2 Homeostáticos



B Expresión de genes DAM

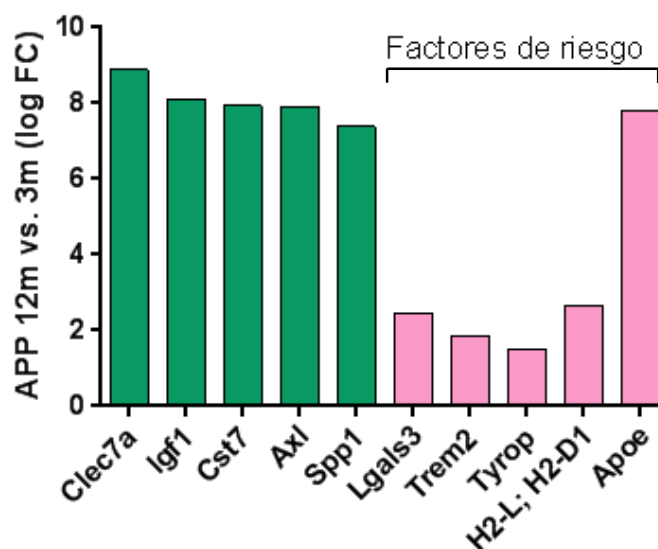


Figura 3.33. Estudio transcriptómico. Aumento en la expresión de genes DAM en microglía activada aislada de corteza e hipocampo de animales APP de 12 meses de edad. Se aisló la microglía activa (Clec7a-positiva) de animales APP de 3 y 12 meses, se extrajo su ARN y se analizó la expresión de genes DAM (**A1**) y genes homeostáticos (**A2**) mediante arrays. El análisis de los datos mediante GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) reveló que los genes DAM muestran un aumento a 12 meses (color rojo) y una disminución de la expresión a los 3 meses (color azul), mientras que los genes homeostáticos se expresan más en la microglía de animales de 3 meses (rojo) y se encuentran disminuidos en animales de 12 meses (azul). **B**, cuantitativamente, se obtuvo que los niveles de expresión de genes DAM en ratones APP era mucho mayor a los 12 que a 3 meses, siendo algunos de estos genes factores de riesgo (*LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP*, *H2-L*, *H2-D1*, *APOE*). Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla/IBIS).

Algunos de los genes cuya expresión en la microglía activada aumenta con la edad, como *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP*, *H2-L*, *H2-D1* y *APOE*, son además de genes de la firma microglial DAM, factores de riesgo para el desarrollo de Alzheimer de tipo esporádico. En los apartados siguientes de este trabajo, se ha profundizado en el estudio celular y subcelular de algunos de estos marcadores expresados por la microglía DAM y su relación con las placas amiloides.

3.2.3. LA MICROGLÍA PERIPLACA PRESENTA SIGNOS DE ACTIVIDAD FAGOCÍTICA

Uno de los genes DAM en los que se ha determinado un aumento de expresión en el hipocampo de nuestro modelo amiloidogénico entre los 3 y los 12 meses de edad es *CD68*. Este gen codifica para una glucoproteína perteneciente a la familia LAMP (proteínas asociadas a la membrana de lisosomas/endosomas), interviniendo en la fagocitosis y en la activación microglial. Mediante inmunofluorescencias dobles a microscopía confocal para microglía con anti-Iba1 o anti-CD45 (Fig. 3.34) junto con anti-CD68 (lisosomas/endosomas) combinadas con tinción con Tioflavina-S (placas amiloides fibrilares) en el hipocampo de animales APP/PS1, se observó que la microglía periplaca activada tenía una alta expresión de CD68, signo de una elevada actividad fagocítica de estas células.

Además, en el hipocampo del modelo APP/PS1 se visualizó con gran frecuencia la presencia de A β intracelular dentro de la microglía que rodea a las placas amiloides (Fig. 3.35). Empleando reconstrucciones en 3D y vistas ortogonales (XZ-YZ) a partir de imágenes de inmunofluorescencia doble a microscopía confocal para Iba1 (microglía) y 4G8 (A β) se comprobó la localización intracelular de A β en la microglía (imágenes representativas en Fig. 3.35 A1-A2). Para comprobar si estos acúmulos intramicrogliales de A β tenían un origen fagocítico, se empleó un triple marcaje para microglía (Iba1), fibras amiloides (Tioflavina-S) y lisosomas/endosomas tardíos (LAMP1) (Fig. 3.35 B-D). Se observó que frecuentemente los acúmulos de fibras amiloides TioS-positivas que se encontraban dentro de la microglía colocalizaban con el compartimento subcelular LAMP1-positivo. Estos resultados sugieren que estos acúmulos amiloides tienen un origen fagocítico. No obstante, también se observó marcaje positivo para fibras amiloides dentro de la microglía que no colocalizaba con este compartimento, pudiendo tener un origen diferente.

Para una mejor caracterización de la microglía activada hemos realizado un estudio ultraestructural a microscopía electrónica de transmisión de estas células en el hipocampo del modelo APP/PS1. El análisis subcelular de estas células permitió identificar signos de actividad fagocítica en la microglía periplaca (microglía DAM). Tanto al emplear inmuno-oro para Iba1 y A β ₄₂ (Fig. 3.36) como a MET convencional (Fig. 3.37), observamos que la microglía que rodea a las placas presenta cuerpos de fagocitosis de gran tamaño con material fibrilar de electrodensidad elevada en su interior. Estos cuerpos fagocíticos se hallan muy cerca de las fibras amiloides, que se entremezclan con el citoplasma microglial. Además, en el citoplasma cercano a estos fagolisosomas hay una gran cantidad de mitocondrias (ver Fig. 3.37 B1), indicando que estas células están realizando funciones que requieren una elevada cantidad de energía, como puede ser la degradación del material fagocitado por la microglía.

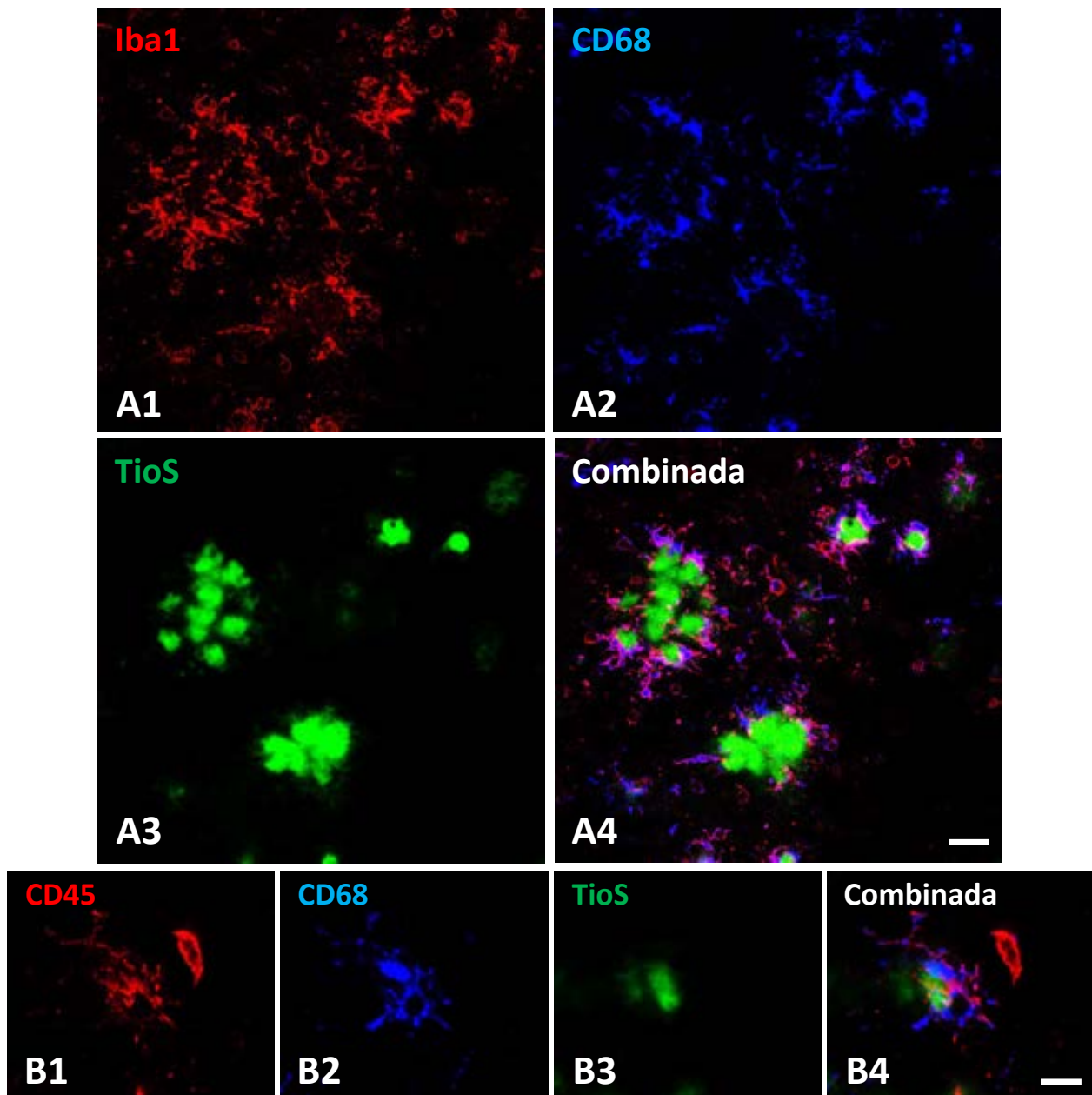


Figura 3.34. La microglía activada alrededor de las placas amiloides expresa CD68 (marcador del fenotipo DAM) en el hipocampo del modelo APP/PS1. **A1-A4**, Inmunofluorescencia doble para Iba1 (A1: microglía, en rojo) y CD68 (A2: marcador lisosomal, en azul) combinada con tinción de Tioflavina-S (A3: core de las placas, en verde). La microglía que rodea a las placas amiloides presenta gran cantidad de marcaje CD68-positivo, tanto en las placas pequeñas, como en las de gran tamaño. **B1-B4**, inmunofluorescencia doble para CD45 (B1: microglía activada, en rojo) y CD68 (B2: lisosomas, en azul) combinada con tinción de Tioflavina-S (B3: core de las placas, en verde). A mayores aumentos, se muestra una placa pequeña rodeada por una célula microglial activada con gran cantidad de lisosomas en su interior. Barras de escala: 20 μm (A1-A4) y 10 μm (B1-B4).

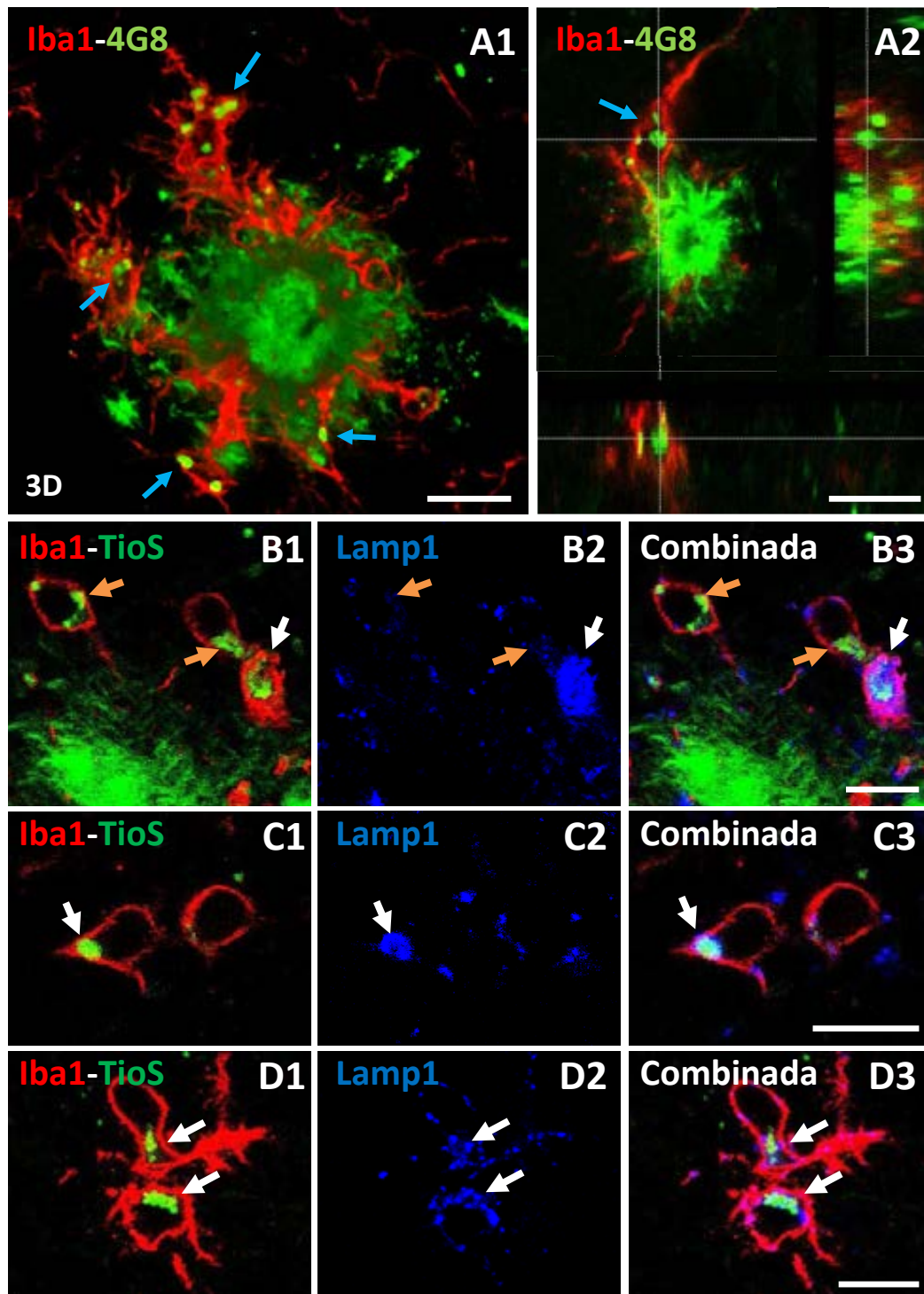


Figura 3.35. La microglía presenta en su interior A β asociado a lisosomas en el hipocampo del modelo APP/PS1. A, inmunofluorescencia doble para Iba1 (rojo, microglía) y 4G8 (verde, A β). Se muestra una reconstrucción en 3D (A1) y una vista ortogonal (A2) de una serie de planos focales. En el interior de la microglía que rodea a las placas hay acúmulos de A β (flechas azules). **B-D**, Marcaje fluorescente triple con anti-Iba1 (B1-D1; rojo, microglía), anti-Lamp1 (B2-D2; azul, lisosomas) y tinción de Tioflavina-S (B3-D3; verde, fibras amiloides). Se muestran células microgliales que se encuentran cerca de placas amiloides (B1-B3) así como en zonas interplaca (C1-C3 y D1-D3), presentando marca positiva para TioS en su interior. Esta marca TioS colocalizaba con la marca Lamp1-positiva (flechas blancas), pero también se observaron acúmulos TioS intracelulares con ninguna o escasa colocalización con Lamp1 (flechas naranjas). Barras de escala: 10 μ m (A, B, C, D).

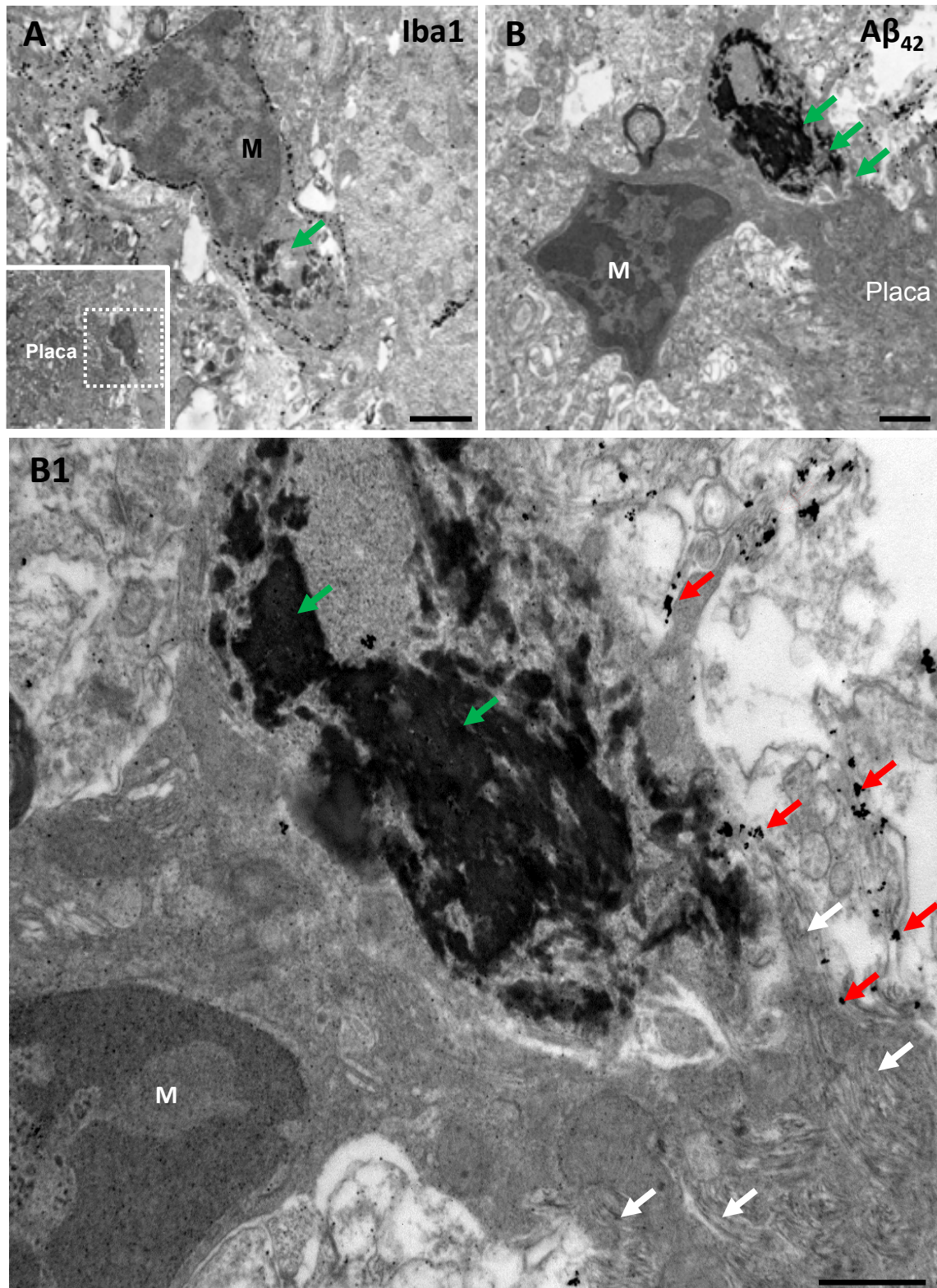


Figura 3.36. Presencia de cuerpos de fagocitosis en el interior de la microglía asociada a placas amiloides en el hipocampo de APP/PS1. Microscopía electrónica de transmisión. **A**, microglía marcada mediante immuno-oro con anti-Iba1 localizada cerca de placa amiloide (ver panorámica inserta en A). **B**, imagen de una célula microglial inmunomarcada para Aβ₄₂ asociada a placa y detalle del contenido de su citoplasma a mayores aumentos (B1). La microglía presenta en su interior un gran fagolisosoma con contenido electrodens (flechas verdes). M: microglía, flechas blancas: fibras amiloides, flechas rojas: inmunomarcaje. Barras de escala: 1 μm (A-B) y 0,5 μm (B1).

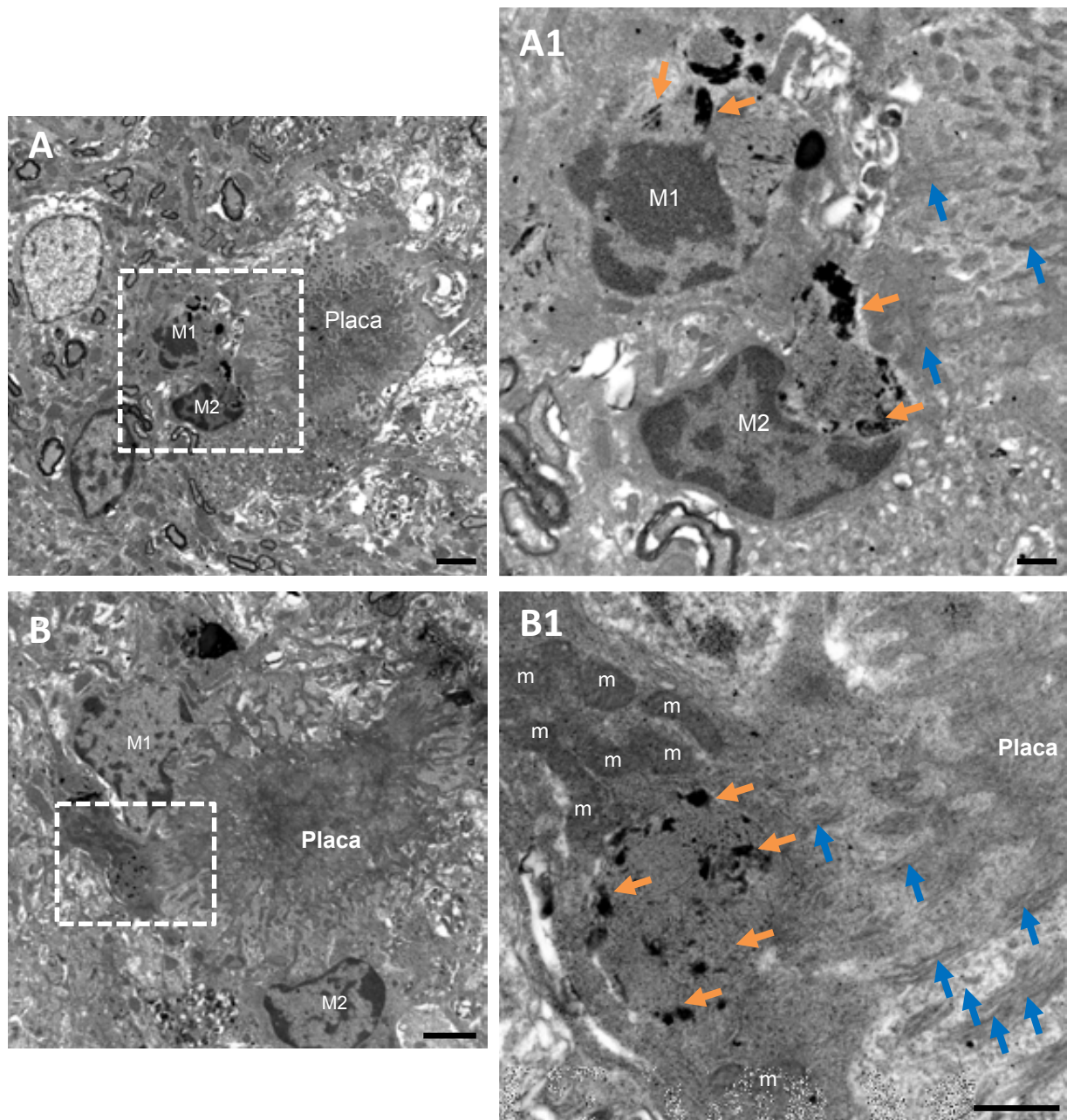


Figura 3.37. Presencia de fagolisosomas con contenido fibrilar electrodens en el interior de microglía periplaca. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del hipocampo del modelo APP/PS1. Se muestran células microgliales en contacto con placas amiloides, presentando en su interior fagolisosomas con contenido fibrilar (flechas naranjas). **A y B**, imágenes panorámicas de placas amiloides. **A1-B1**, detalles de las zonas recuadradas en A y B. En B1 se aprecia como el citoplasma microglial no presenta límites de separación con las fibras amiloides (flechas azules) de la placa. M1 y M2: diferentes células microgliales, m: mitocondrias. Barras de escala: 2 μm (A-B) y 0,5 μm (A1-B1).

La microscopía electrónica de transmisión nos permitió además identificar distintos subtipos ultraestructurales de microglía en el hipocampo del modelo APP/PS1 (Figs. 3.38-3.40). La microglía homeostática interplaca (Fig. 3.38) presentaba unas características ultraestructurales diferentes a la microglía activada (DAM) asociada a placas, no presentando signos de actividad fagocítica (sin presencia de fagolisosomas en su citoplasma). Este subtipo de microglía se caracteriza por presentar una electrodensidad moderada en su citoplasma, un núcleo con gran cantidad de eucromatina, abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER) y mitocondrias, indicando que se trata de células con alta actividad biosintética. Por otro lado, en relación a la microglía activada periplaca se observó un subtipo microglial caracterizado por un citoplasma con elevada electrodensidad. Esta microglía, denominada oscura (Fig. 3.39), se encontraba siempre asociada a las placas amiloides, nunca lejos de estas, y se caracterizaba por presentar fagolisosomas en su interior, cisternas del RER dilatadas y un núcleo más electrodenso y con mayor cantidad de heterocromatina que la microglía no asociada a placas. Dentro de la población de microglía periplaca, además de identificar microglía oscura, también se observó microglía activada con citoplasma de electrodensidad intermedia. Mediante inmunomarcaje con oro coloidal para CD45 a microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.40), se observó que, pese a que las diferentes subpoblaciones células microgliales alrededor de las placas mostraban un citoplasma de diferente electrodensidad (poco electrodenso, electrodensidad intermedia, o muy electrodenso), todas las células eran positivas para CD45, estando por tanto en estado activado. La microglía con electrodensidad intermedia comenzaba a presentar signos de actividad fagocítica elevada, y podría tratarse de un paso intermedio entre la microglía poco electrodensa y la microglía oscura.

La microglía no solo podría intervenir en la fagocitosis de A β , sino también en fagocitar neuritas distróficas que se forman alrededor de las placas amiloides como consecuencia de la toxicidad de estas sobre las prolongaciones axonales del parénquima adyacente. Mediante inmunofluorescencia doble a microscopía confocal empleando anti-Iba1 (microglía) y anti-APP (marcador de neuritas distróficas en el modelo amiloidogénico) (Fig. 3.41 A), se observó que la microglía periplaca también rodeaba y envolvía con sus prolongaciones a las neuritas distróficas. Para estudiar la relación entre las distrofias neuríticas y la microglía a nivel ultraestructural, se empleó inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión con los marcadores CD45 y ferritina (Fig. 3.41 B-D). La expresión de ferritina está incrementada en la microglía (mediante transcriptómica, el gen *FTH1* incrementa 1,82 fold change; $P=0,0028$; en APP de 12 meses de edad respecto a WT de la misma edad), tal vez debido al aumento en el estrés oxidativo y la alteración de la homeostasis del hierro. Por tanto, hemos usado la ferritina como marcador microglial. A microscopía electrónica de transmisión también se visualizó microglía, positiva para CD45 y para ferritina, en contacto con distrofias neuronales, contactando a través de sus cuerpos celulares (Fig. 3.41 B) y, más frecuentemente, a través de sus prolongaciones (Fig. 3.41 C-D), que parecían envolver completamente a las distrofias. De forma esporádica, se detectó la presencia de neuritas distróficas dentro del citoplasma microglial (Fig. 3.42). Las neuritas distróficas en nuestro modelo son de origen axonal/presináptico (ver Sanchez-Varo et al. 2012) y se identifican bien por presentar una gran cantidad de vesículas autofágicas de contenido heterogéneo. Estas distrofias en el citoplasma microglial están envueltas por una doble membrana sugiriendo que han sido fagocitadas por la

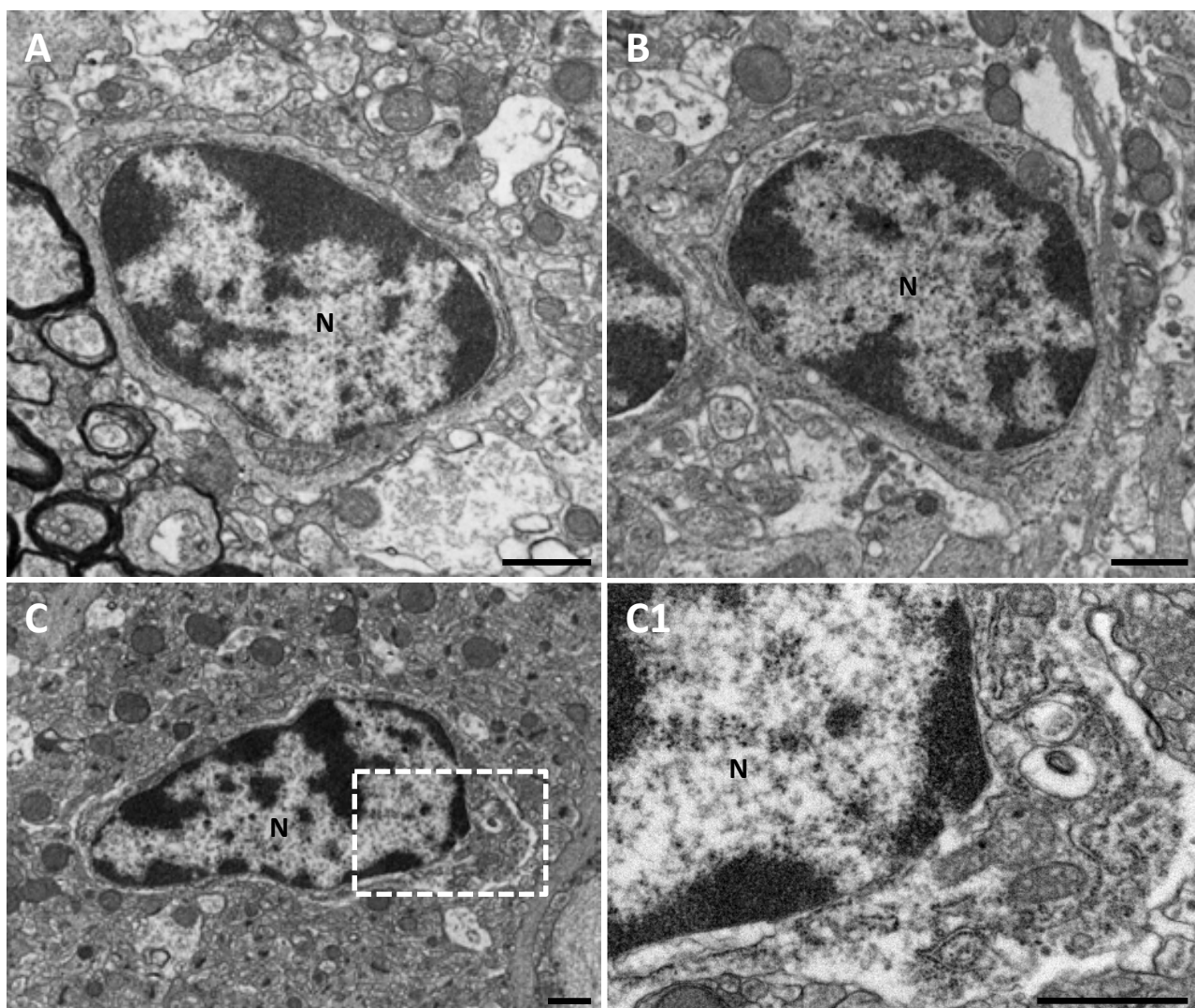


Figura 3.38. Características ultraestructurales de la microglía homeostática en el modelo APP/PS1. Microscopía electrónica de transmisión. **A-C**, Se muestran distintas imágenes de microglía interplaca, con un núcleo (N) rico en eucromatina. En **C1** se muestra un detalle a mayores aumentos del citoplasma de este subtipo microglial, con gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias. No se aprecian características subcelulares de actividad fagocítica. Este subtipo microglial presenta un citoplasma de baja o moderada electrodensidad a microscopía electrónica. Barras de escala: 1 μ m.

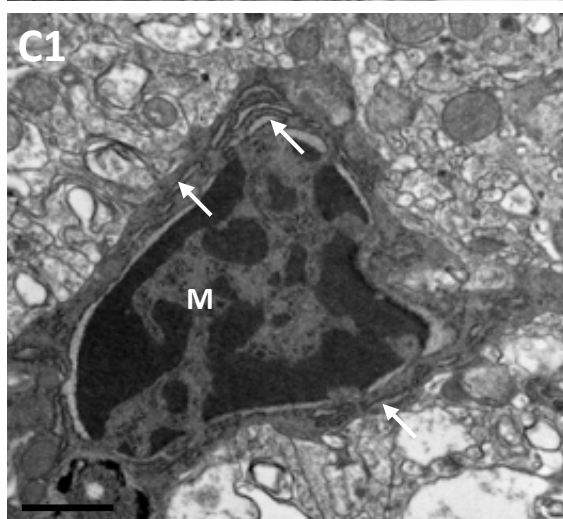
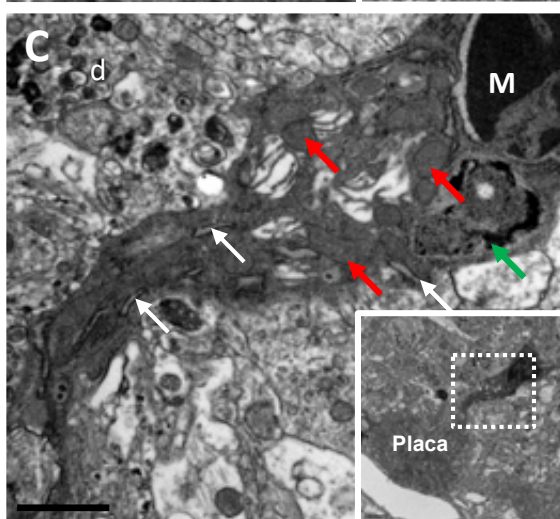
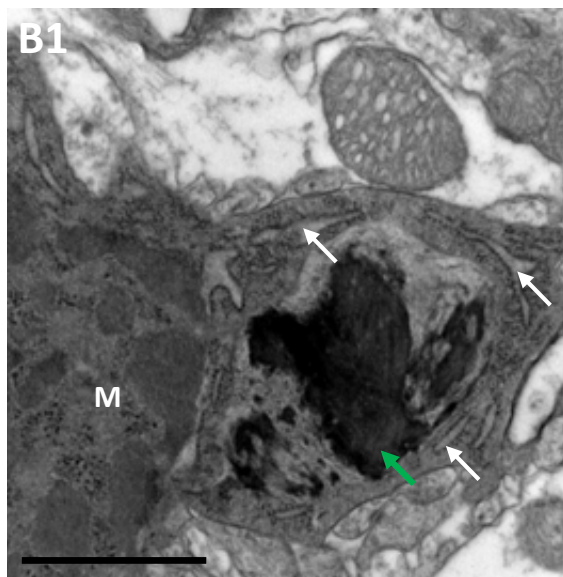
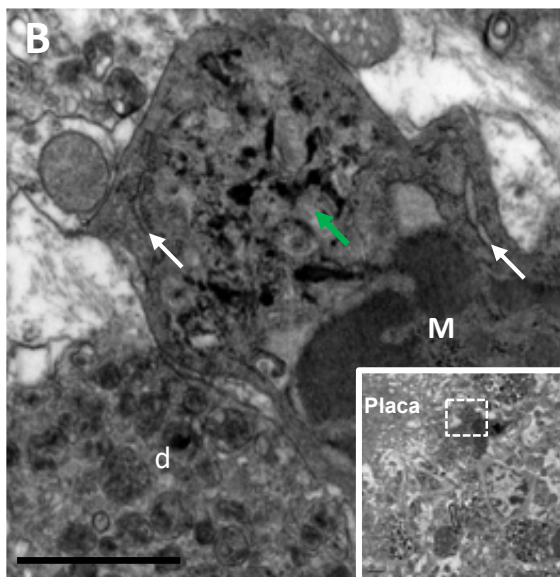
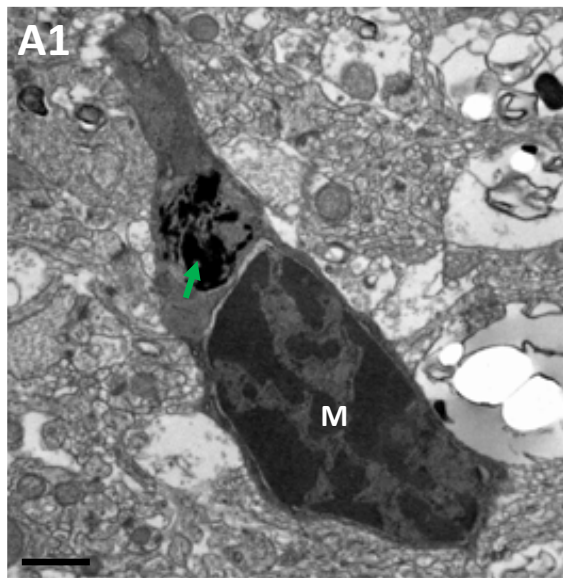
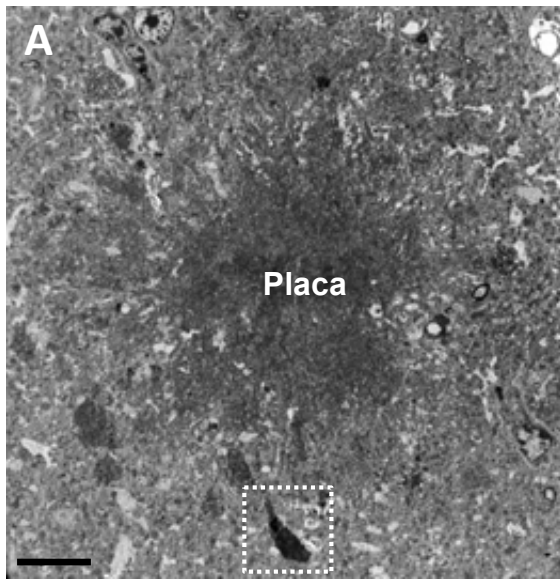


Figura 3.39. Microglía oscura asociada a las placas amiloides en el hipocampo de APP/PS1. Microscopía electrónica de transmisión. A nivel ultraestructural se distingue un subtipo de microglía por la elevada electrodensidad de su citoplasma (microglía oscura). Se muestran distintas imágenes de microglía (M) oscura asociada a placas amiloides. **A**, panorámica de una placa amiloide de gran tamaño con microglía oscura en su periferia. **A1**, detalle a mayores aumentos del recuadro en A, el citoplasma microglial presenta un gran fagolisosoma (flecha verde). **B-B1** y **C-C1**, imágenes a mayores aumentos del contenido subcelular de la microglía oscura cercana a una placa amiloide (ver panorámicas insertas en B y C). La microglía oscura presenta fagolisosomas con contenido heterogéneo (flechas verdes) y cisternas del retículo endoplásmico rugoso dilatadas (flechas blancas). El núcleo también presenta una elevada electrodensidad y un alto contenido en heterocromatina. La eucromatina tiene un aspecto granuloso. La alta electrodensidad del citoplasma dificulta la identificación de algunos orgánulos como las mitocondrias (flechas rojas). Barras de escala: 10 μm (A) y 1 μm (A1, B-B1, C-C1).

CD45

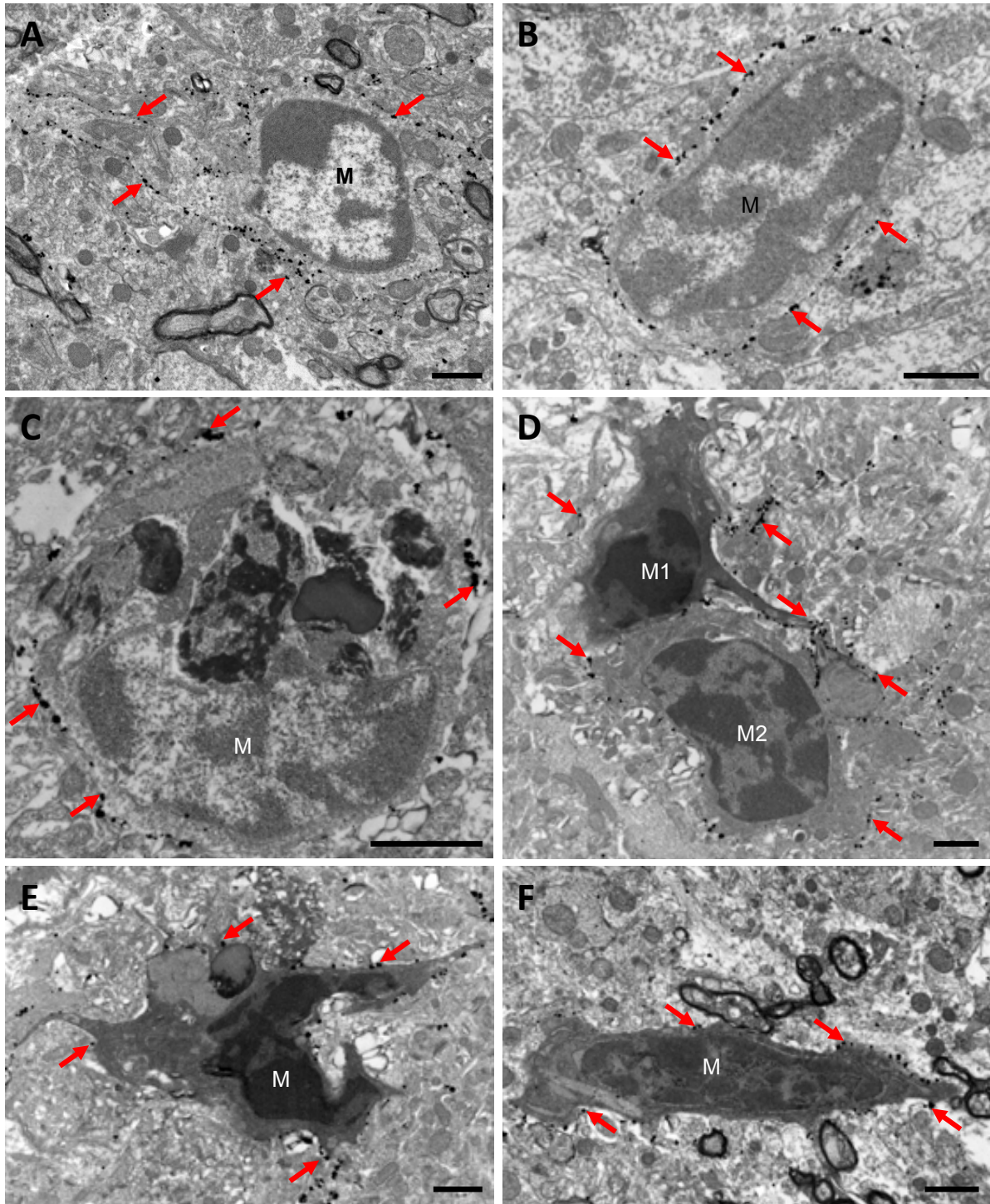


Figura 3.40. Subtipos ultraestructurales de microglía asociada a placa visualizados con inmuno-oro para anti-CD45 a microscopía electrónica de transmisión. Las células microgliales (M) cercanas a placas amiloides son positivas para CD45. La marca inmunorreactiva (flechas rojas) se encuentra principalmente asociada a la membrana. Se observan distintos niveles de electrodensidad en el citoplasma de las células microgliales. **A-B**, microglía poco electrodensa; **C**, microglía con electrodensidad intermedia; **D-F**, microglía electrodensa (microglía oscura). Barras de escala: 1 μ m.

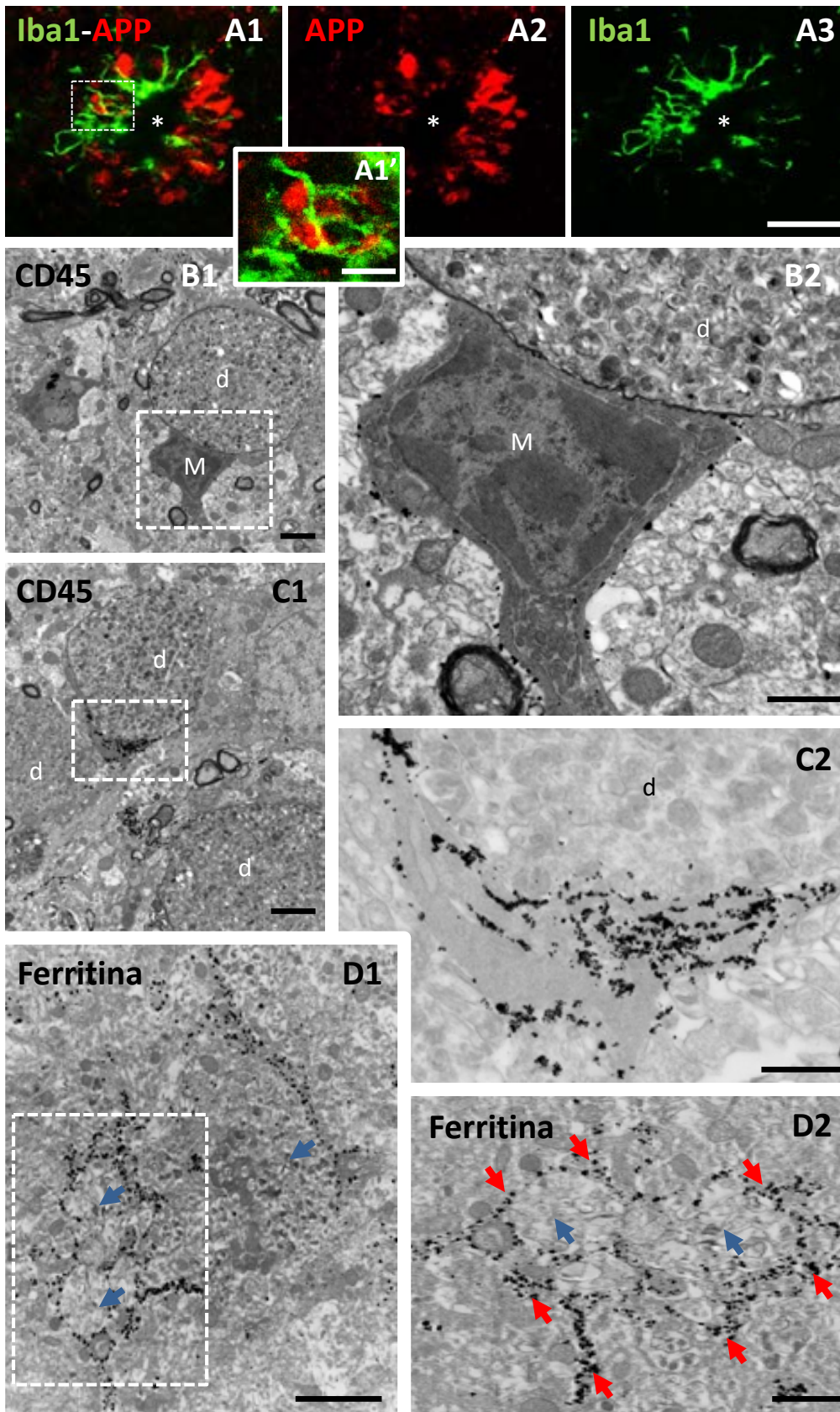


Figura 3.41. Las prolongaciones microgliales rodean y envuelven a neuritas distróficas en el hipocampo del modelo APP/PS1. **A**, inmunofluorescencia doble (A1) con anti-APP (A2: rojo; neuritas distróficas) y anti-Iba1 (A3: verde; microglía) a microscopía láser confocal. En A1' se muestra en mayor detalle la zona recuadrada en A con prolongaciones microgliales rodeando distrofias neuronales; la placa amiloide se indica con un asterisco. **B-D**, inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión. **B** y **C**, inmuno-oro para CD45 mostrando una célula microglial (M) en contacto con una distrofia neuronal (d) caracterizada por la acumulación de vesículas autofágicas. **B2** es un detalle a mayores aumentos del recuadro en B1, y **C2** del recuadro en C1. **D**, inmuno-oro para anti-ferritina mostrando distrofias (flechas azules) envueltas por prolongaciones microgliales ferritina-positivas (flechas rojas). **D2**, detalle a mayores aumentos del recuadro en D1. Barras de escala: 20 μm (A1-A3), 5 μm (A1'), 2 μm (B1, C1 y D1), 1 μm (B2 y D2) y 0,5 μm (C2).

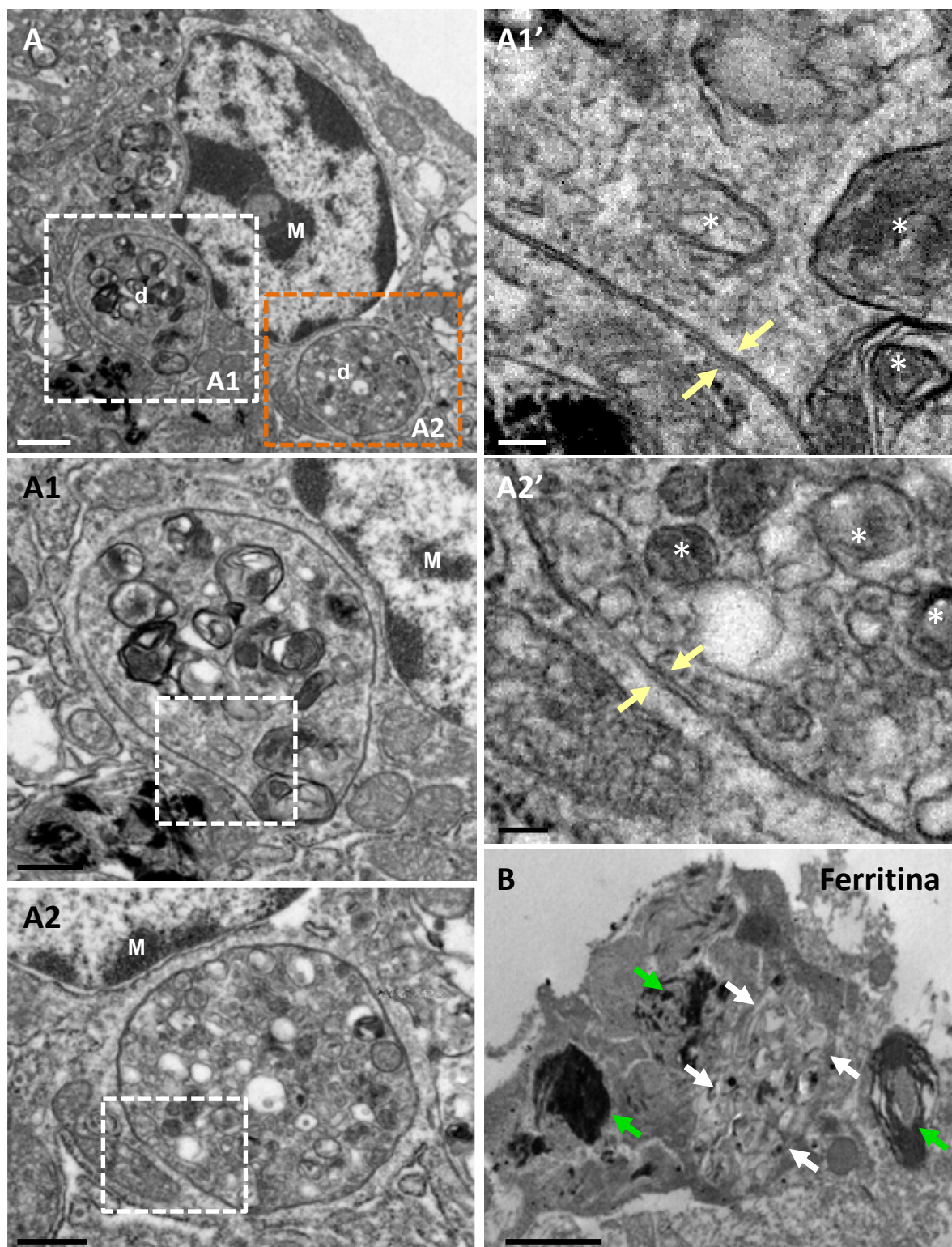


Figura 3.42. Neuritas distróficas internalizadas por células microgliales. Microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de APP/PS1 de 12 meses. **A**, célula microglial (M) con dos neuritas distróficas (d) en su interior. **A1** y **A2**, detalles a mayores aumentos de los recuadros de la imagen A. **A1'** y **A2'**, detalles de las zonas recuadradas en A1 y A2, respectivamente, señalando la doble membrana (flechas amarillas) que rodea las distrofias. Las neuritas presentan en su interior vesículas heterogéneas autofágicas (asteriscos). **B**, inmuno-oro para ferritina mostrando una célula microglial conteniendo una estructura con aspecto de neurita distrófica en su interior (flechas blancas), y varios fagolisosomas electrodensos (flechas verdes). Barras de escala: 1 μm (A y B), 0,5 μm (A1 y A2) y 0,1 μm (A1' y A2').

microglía, la membrana interna correspondería a la membrana neuronal y la membrana externa a la de la microglía.

En resumen, mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas se han observado a microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión evidencias que indican que la microglía alrededor de las placas amiloides presenta actividad fagocítica y que podría estar internalizando el A β y tratando de degradarlo. Además, se ha observado que la microglía periplaca presenta un citoplasma con grado de electrodensidad variable que podría estar ligado a cambios en la función microglial.

3.2.4. EVIDENCIAS ULTRAESTRUCTURALES DE LA POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LA MICROGLÍA EN LA FORMACIÓN DE LAS PLACAS AMILOIDES

Como se ha mencionado previamente, las fibras amiloides se encuentran a menudo en el interior del cuerpo celular de la microglía alrededor de las placas en el hipocampo del modelo APP/PS1. En la **figura 3.43 A** se muestra una inmunofluorescencia para Iba1 (microglía) combinada con tinción con DAPI (núcleo celular) y con Tioflavina-S (fibras amiloides), ilustrando cómo las fibras amiloides están dentro del citoplasma microglial. Mediante inmunofluorescencia doble para Iba1 (microglía) y LAMP1 (lisosomas) combinada con tinción con Tioflavina-S (fibras amiloides), se observó que las fibras amiloides intramicrogliales en ocasiones no colocalizaban con el compartimento lisosomal, tal y como se muestra en la **figura 3.43 B**. Esto sugiere que estas fibras amiloides no parecen tener un origen fagocítico ni están siendo degradadas por la vía lisosomal. A microscopía electrónica de transmisión con inmunomarcaje para A β_{42} , se visualizaron estructuras similares a lo observado a microscopía láser confocal en forma de acúmulos de fibras amiloides de pequeño tamaño que se hallaban en íntimo contacto con el cuerpo celular de la microglía, sin observarse un límite claro entre las fibras amiloides y el citoplasma microglial (**Fig. 3.43 C**). En este tipo de acúmulos amiloides de pequeño tamaño, la microglía rodea completamente al depósito, que parece estar dentro del cuerpo celular microglial, y los orgánulos se encuentran muy próximos a las fibras amiloides. En la **figura 3.44** se muestran imágenes panorámicas y detalles representativos de esta estrecha relación del citoplasma microglial con las fibras amiloides a microscopía electrónica mediante inmuno-oro para A β_{42} y MET convencional. En muchas ocasiones, no se apreciaba la existencia de una membrana celular separando el citoplasma microglial y las fibras amiloides. En la zona de contacto con las fibras amiloides, el citoplasma microglial presentaba una gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER), indicando que estas células tienen actividad biosintética polarizada hacia las fibras amiloides. Estas cisternas del RER se encontraban en íntimo contacto con las fibras amiloides (**Fig. 3.45**, inmuno-oro para MET con anti- A β_{42}), indicando que en la zona de contacto microglía-placa ocurre una elevada síntesis de proteínas que podrían liberarse hacia la placa amiloide contribuyendo a la fibrilación/agregación del amiloide. Además de haber una gran cantidad de cisternas de RER en la zona de contacto microglía-placa, también se observa abundancia de mitocondrias, indicando que esta microglía biosintética tiene un alto metabolismo energético (**Fig. 3.46**). El citoplasma microglial presenta un aspecto granuloso debido a la elevada cantidad de vesículas de pequeño tamaño, apoyando la posibilidad de que las proteínas sintetizadas en el RER sean transportadas hacia el depósito amiloide.

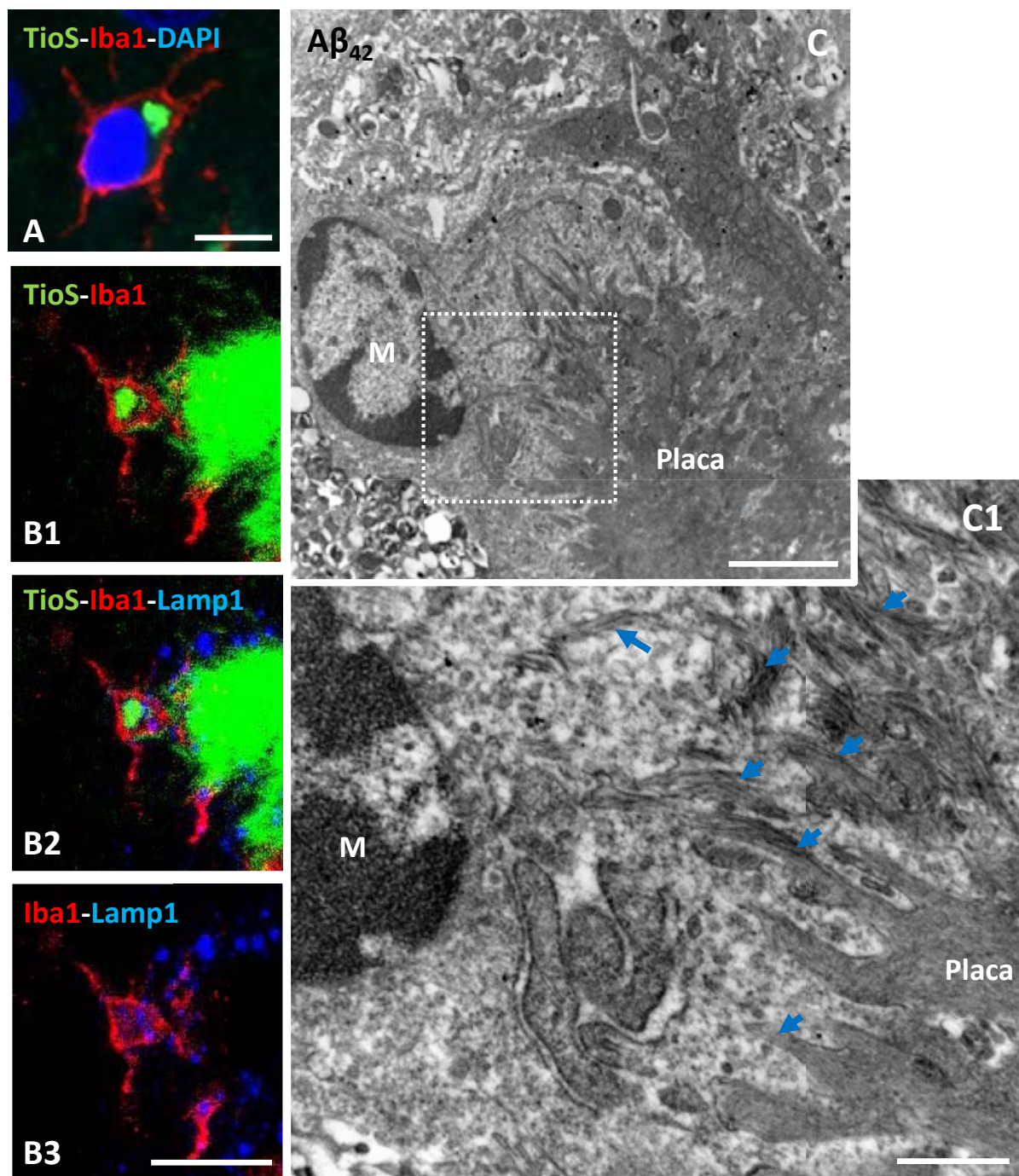


Figura 3.43. Presencia de fibras amiloides en el citoplasma microglial no asociadas a degradación. **A**, inmunofluorescencia para Iba1 (rojo, microglía) combinada con tinciones con DAPI (azul, núcleo celular) y Tioflavina-S (verde, fibras amiloides). **B**, triple marcaje fluorescente con anti-Iba1 (rojo, microglía), anti-Lamp1 (azul, lisosomas) y tinción de Tioflavina-S (verde, fibras amiloides). Marca positiva para TioS dentro de la microglía que no colocaliza con la marca para Lamp1. **C**, inmuño-oro a microscopía electrónica de transmisión para $A\beta_{42}$. **C1** es un detalle del recuadro en C. Se muestra una célula microglial (M) que rodea o contiene una placa amiloide. No se observa un límite definido entre el citoplasma microglial y las fibras amiloides (flechas azules). Barras de escala: 10 μm (B1-3), 5 μm (A), 2 μm (C) y 0,5 μm (C1).

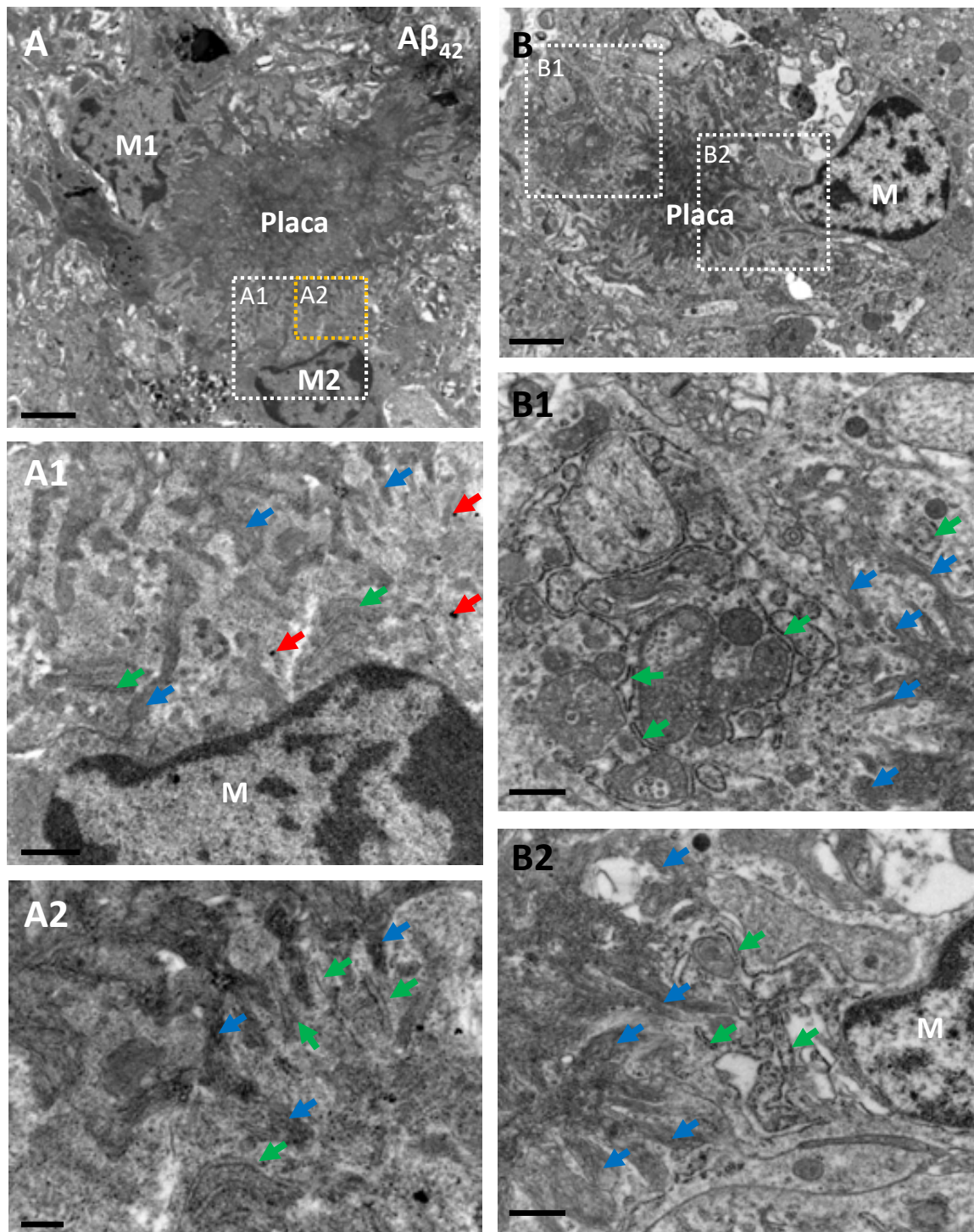


Figura 3.44. Estrecha interacción entre el citoplasma microglial y las fibras amiloides. Microscopía electrónica de transmisión mostrando la estrecha relación entre las placas amiloides y el citoplasma de la microglía asociada (M). **A**, inmuno-oro a microscopía electrónica para $A\beta_{42}$. **B**, microscopía electrónica de transmisión convencional. En **A1-A2** y **B1-B2** se muestran detalles de las zonas recuadradas en A y en B, respectivamente. El citoplasma de la microglía envuelve a la placa, y los orgánulos se hallan muy próximos a las fibras amiloides, sin observarse claramente membrana plasmática que los separe. Destaca la presencia de abundante retículo endoplasmático rugoso en la cercanía de las fibras amiloides. Flechas rojas: inmunomarcaje; flechas azules: fibras amiloides; flechas verdes: retículo endoplasmático rugoso; M1 y M2: distintas células microgliales. Barras de escala: 2 μm (A y B), 0,5 μm (A1 y B1-B2) y 0,2 μm (A2).

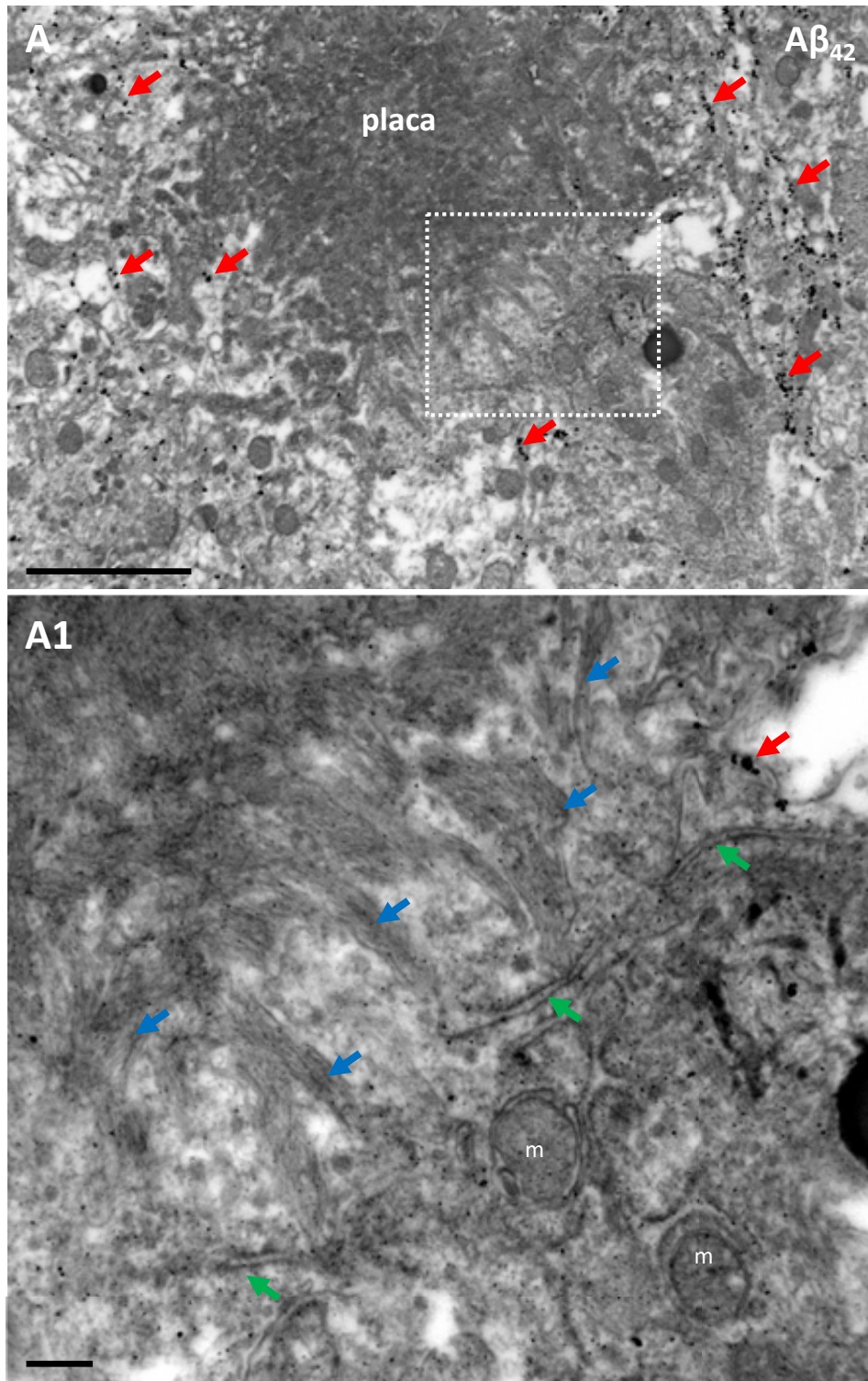


Figura 3.45. El retículo endoplasmático rugoso de la microglía está próximo a las fibras amiloides de la periferia de la placa. Imágenes a microscopía electrónica de transmisión de hipocampo de APP/PS1 con inmuno-oro para $A\beta_{42}$ (flechas rojas). **A**, panorámica de una placa amiloide de pequeño tamaño con marca periférica para $A\beta_{42}$. **A1**, detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en A. El citoplasma microglial contacta de forma muy estrecha con las fibras amiloides (flechas azules), no distinguiéndose claramente el límite entre ambos. Se observa una gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático rugoso (flechas verdes) en la zona limítrofe microglía-placa. m: mitocondrias. Barras de escala: 2 μ m (A) y 0,2 μ m (A1).

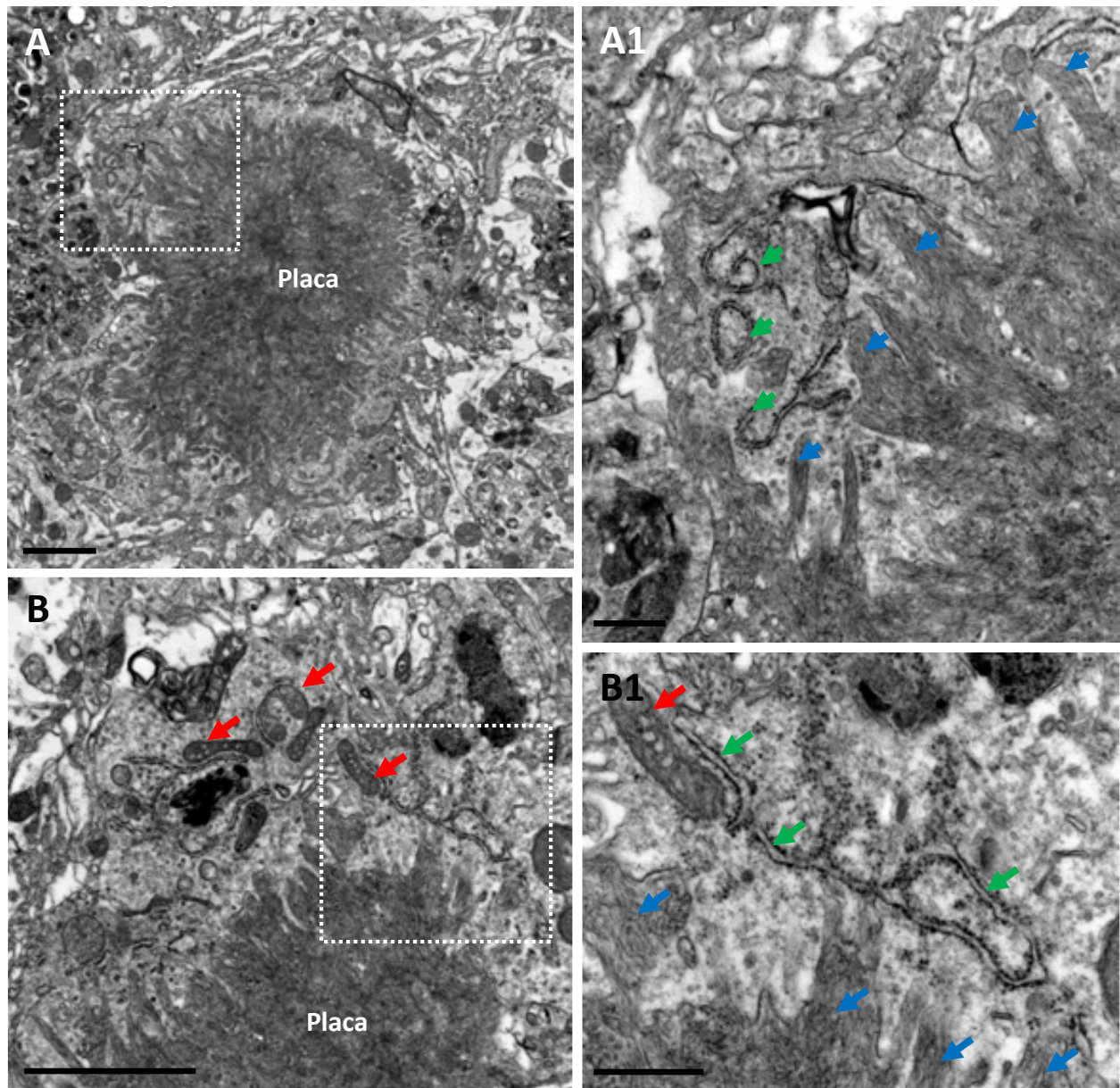


Figura 3.46. El citoplasma microglial es rico en cisternas de retículo endoplasmático rugoso en la zona de contacto microglía-placa. A y B, imágenes a microscopía electrónica de transmisión mostrando placas amiloides de pequeño tamaño totalmente rodeadas por citoplasma microglial. A1 y B1, se muestran detalles a grandes aumentos de las zonas recuadradas en A y B, respectivamente. Se observa gran cantidad de retículo endoplasmático (flechas verdes) y mitocondrias (flechas rojas) cerca de las fibras amiloides (flechas azules). El citoplasma microglial es rico en pequeñas vesículas, dándole un aspecto granuloso. Barras de escala: 2 μm (A y B) y 0,5 μm (A1 y B1).

A microscopía electrónica de transmisión con inmunomarcaje para A β ₄₂ (Fig. 3.47 A) y para ferritina (Fig. 3.47 B), también se observó que en el hipocampo del modelo animal las prolongaciones electrodensas de la microglía oscura contactaban de forma estrecha con las placas amiloides, desdibujándose el límite entre el citoplasma de la microglía y las fibras amiloides. En la zona de contacto microglía-placa hay un elevado número de mitocondrias, indicando un alto metabolismo energético en este subtipo microglial vinculado con la patología amiloide. Es de destacar que en esta región de íntimo contacto microglía-placa hemos identificado mitocondrias y vesículas de distinta naturaleza, rodeadas y entremezcladas con las fibras amiloides de la periferia de la placa (Fig. 3.48), lo que prueba la relación física entre el citoplasma microglial y las fibras amiloides. Esto constituye una evidencia ultraestructural de que la microglía, o un subtipo específico de microglía, está implicado en la formación de las fibras amiloides.

Estos resultados en su conjunto indican que la microglía también puede presentar en su interior fibras amiloides que no tienen un origen fagocítico, puesto que no están asociadas a fagolisosomas. La microglía que contiene estos depósitos presenta características ultraestructurales que indican una alta actividad biosintética cerca de las fibras amiloides, por lo que podría estar sintetizando moléculas que contribuyen a la formación/fibrilación de las fibras amiloides.

3.2.5. MICROGLÍA ACTIVADA Y AGREGACIÓN DE LAS PLACAS AMILOIDES. GALECTINA 3 Y ASC

En el estudio transcriptómico que realizamos, se observó un aumento de 100 veces en la expresión de *LGALS3* con la edad en la microglía activa. Este gen, relacionado con el perfil de activación DAM de la microglía, es un factor de riesgo para el desarrollo del Alzheimer y codifica para la galectina 3 (gal3). Esta lectina participa en la respuesta inflamatoria y también se le han atribuido funciones relacionadas con la agregación de A β . Por todo ello, quisimos estudiar a nivel histológico la expresión de esta lectina y su relación ultraestructural con las placas amiloides en nuestro modelo APP/PS1. Mediante inmunohistoquímica doble a campo claro para A β oligomérico prefibrilar (OC) y gal3 (Fig. 3.49 A-C), se observó un aumento en la inmunorreactividad para galectina 3 en el hipocampo entre los 6 y los 12 meses. Las células gal3-positivas estaban asociadas a las placas amiloides y presentaban la morfología característica de la microglía activa (prolongaciones engrosadas y acortadas) (Fig. 3.49 C). No obstante, no todas las placas amiloides se hallaban rodeadas de células gal3 positivas, observándose placas con mayor recubrimiento que otras sin que esto estuviera ligado al tamaño o a la localización de las placas. El estudio cuantitativo del área inmunomarcada para gal3 en la región CA1 (Fig. 3.49 D) reveló que se producía un aumento significativo entre los 6 y los 12 meses ($3,89 \pm 1,66$ veces, T-test, $P=0,042$). Mediante inmunofluorescencia triple a microscopía confocal para CD45 (microglía activada), gal3 y 4G8 (A β), se comprobó que las células gal3 positivas alrededor de las placas amiloides eran de naturaleza microglial y estaban activadas (Fig. 3.50). Tras corroborar que estas células gal3-positivas eran microglía activada, se procedió al análisis ultraestructural del marcador gal3 mediante inmunomarcaje con oro para microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.51). Mediante MET se observó que esta lectina se localiza de forma mayoritaria en el citoplasma microglial que se encuentra alrededor

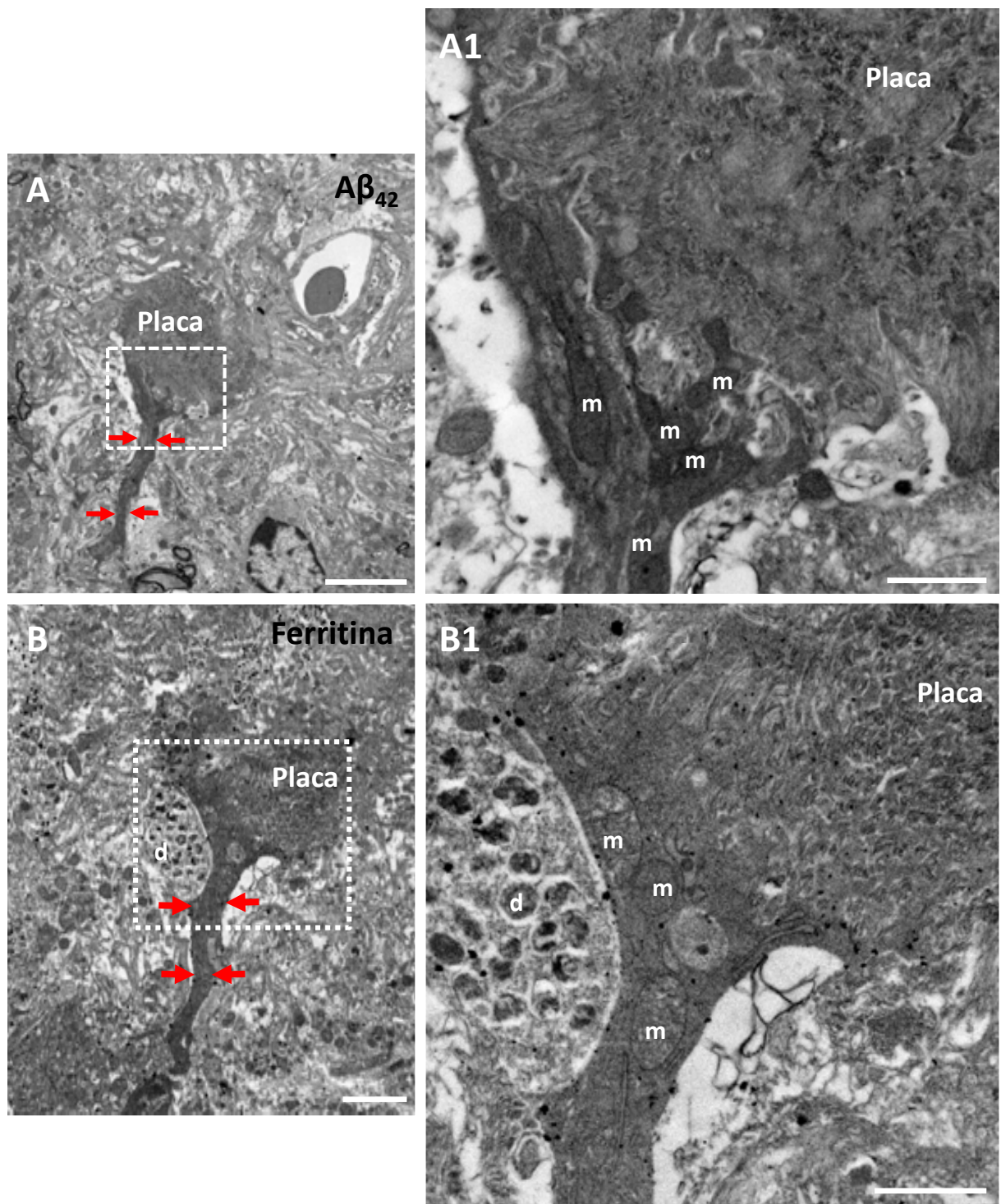


Figura 3.47. La zona de contacto entre las prolongaciones microgliales y las fibras amiloides puede presentar gran cantidad de mitocondrias. Imágenes a microscopía electrónica de transmisión mostrando prolongaciones microgliales electrodensas contactando con placas amiloides de pequeño tamaño. Inmunomarcaje con oro para $A\beta_{42}$ (A) y ferritina (B). En A1 y B1 se muestran detalles a grandes aumentos de las zonas recuadradas en A y B, respectivamente. Se observa gran cantidad de mitocondrias (m) en las prolongaciones microgliales (flechas rojas) que contactan con las placas amiloides. d: neurita distrófica. Barras de escala: 5 μm (A), 2 μm (B) y 1 μm (A1 y B1).

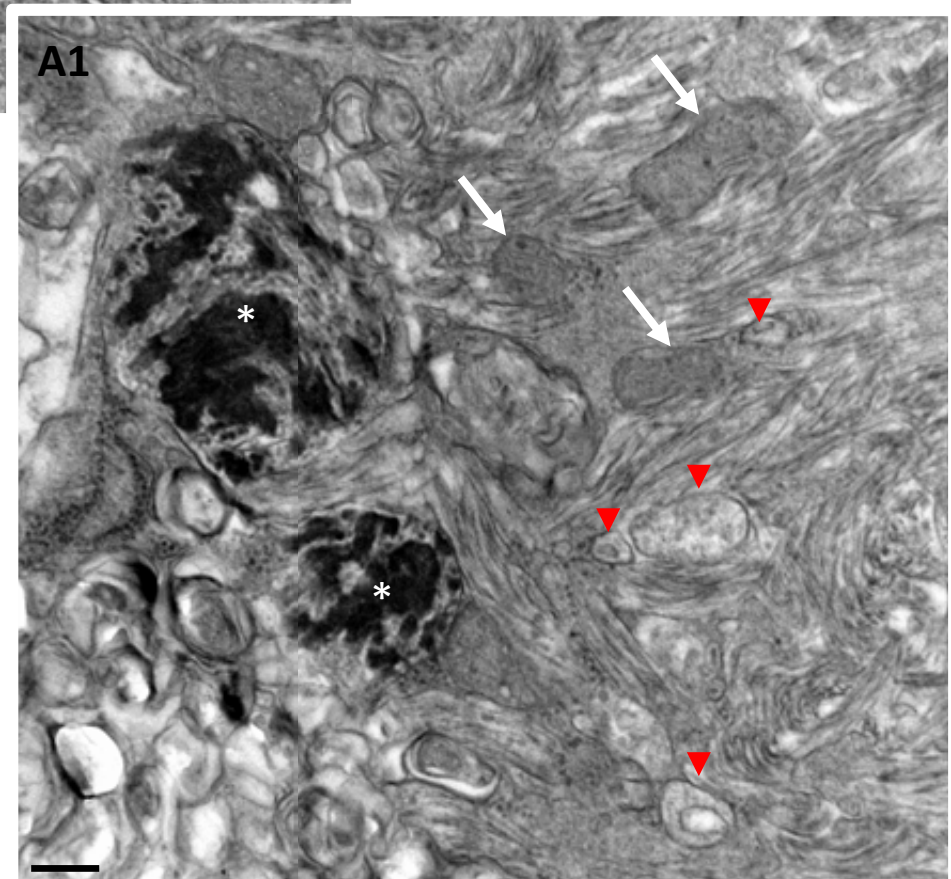
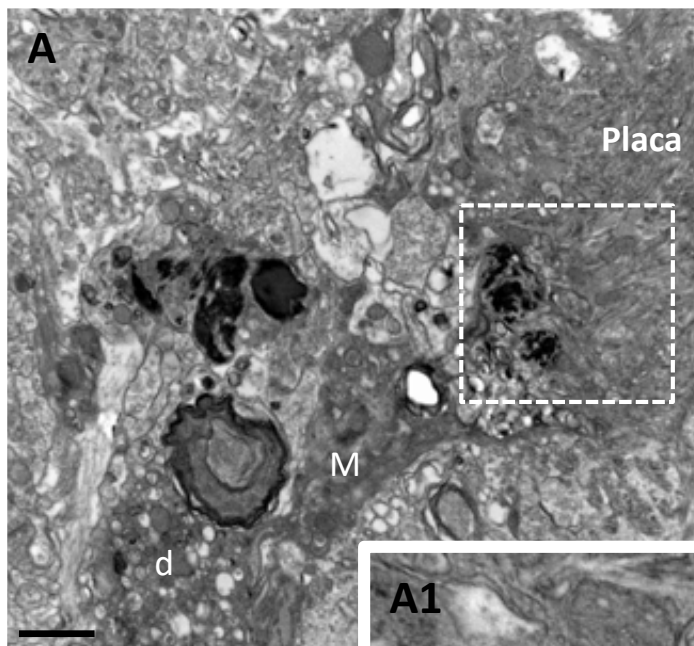


Figura 3.48. Las mitocondrias microgliales se entremezclan con las fibras amiloides en la zona de contacto con las placas. **A**, panorámica de una placa amiloide contactada por la microglía (M). **A1**, detalle de la zona de contacto entre el citoplasma microglial y las fibras amiloides (recuadro en A). Las mitocondrias (flechas blancas) están en contacto con las fibras amiloides. Se observan vesículas poco electrodensas (puntas de flecha rojas) y cuerpos fagocíticos electrodensos (asteriscos). d: neurita distrófica. Barras de escala: 1 μm (A) y 0,2 μm (A1).

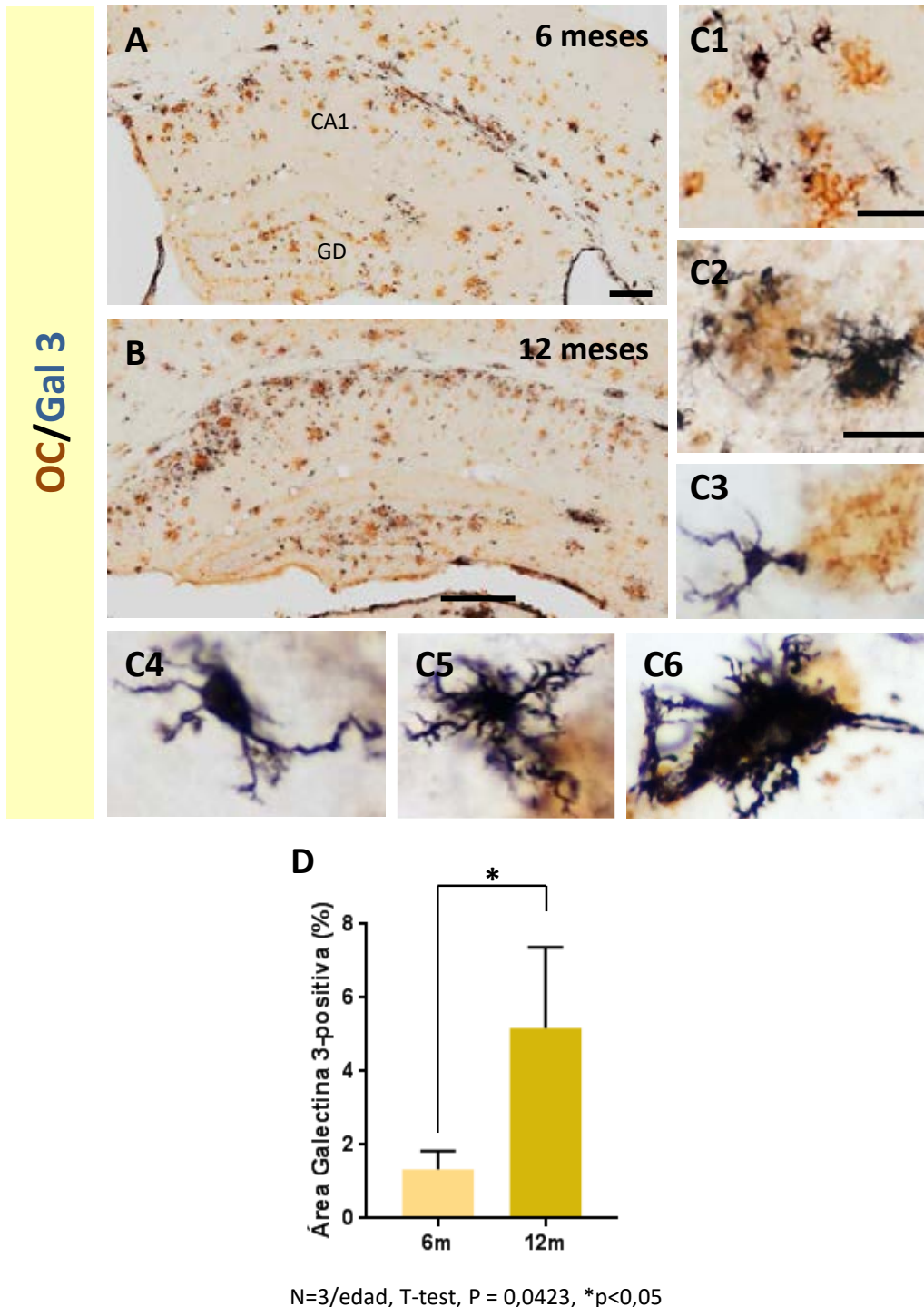


Figura 3.49. Aumento de la expresión de galectina-3 con la progresión de la patología en el hipocampo del modelo APP/PS1. A-C, inmunohistoquímica doble a campo claro para gal3 (azul-negro) y Aβ (anticuerpo OC, en marrón-anaranjado) en el hipocampo ratones APP/PS1 de 6 (A) y 12 (B) meses de edad. C1-C3, detalles de placas amiloides con microglía gal3-positiva asociada en animales de 6 (C1) y 12 (C2-C3) meses de edad. C4-C6, detalle de varias células gal3-positivas mostrando la morfología típica de la microglía activada. D, estudio cuantitativo del área inmunorreactiva para gal3 en la región CA1. Los datos representados corresponden a las medias ± SD. La estadística y significancia se indican en la gráfica. CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado. Barra de escala: 200 μm (A-B), 50 μm (C1) y 20 μm (C2-C6).

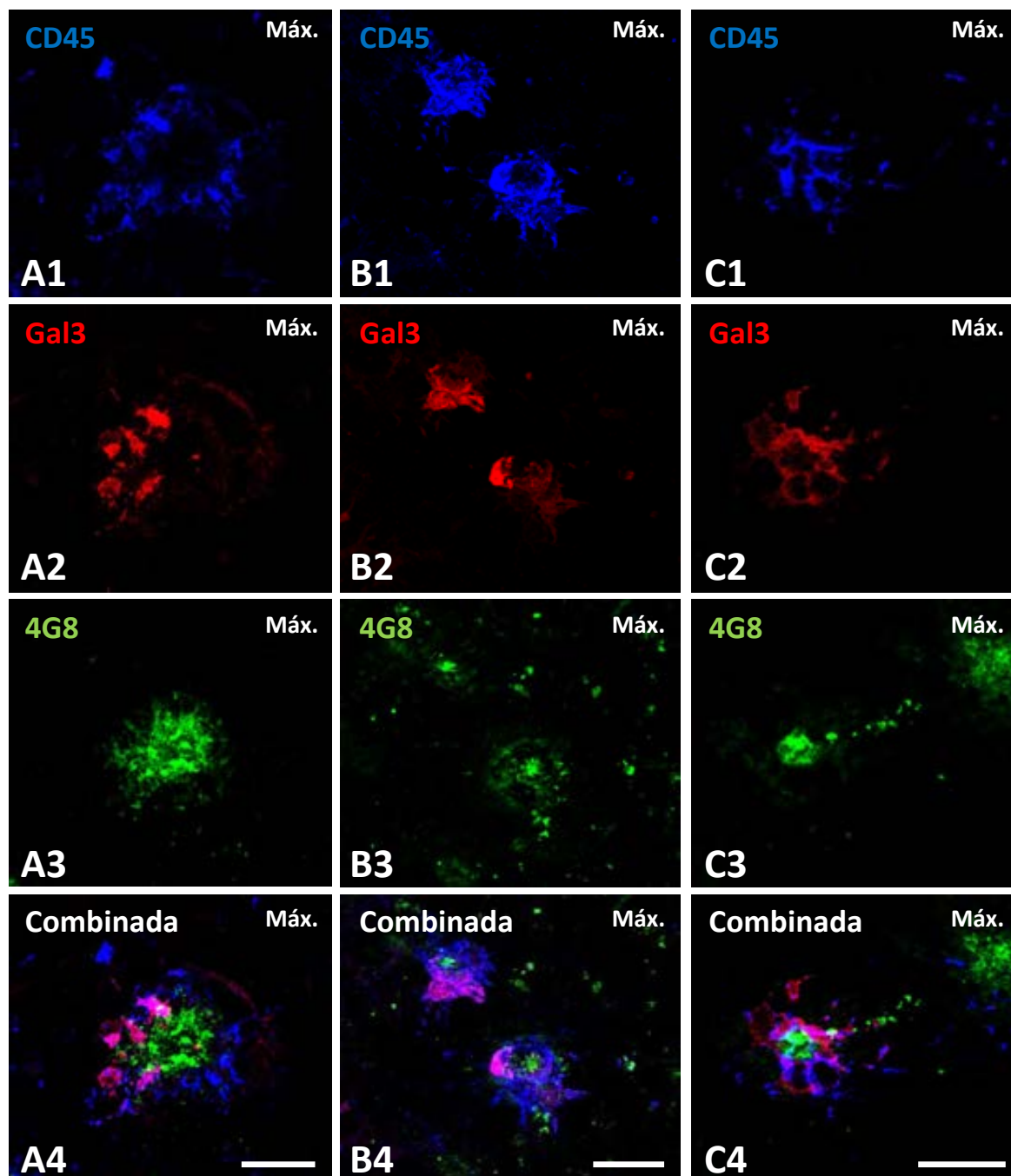


Figura 3.50. Las células galectina3 positivas que rodean a las placas amiloides son microglía activada. A-C, inmunofluorescencia triple a microscopía láser confocal para CD45 (A1-C1; microglía activada en azul), gal3 (A2-C2; en rojo) y A β (A3-C3; anticuerpo 4G8, en verde) en el hipocampo ratones APP/PS1 de 12 meses de edad. Las células gal3-positivas expresan el marcador de microglía activada CD45. Barras de escala: 20 μ m.

Galectina 3

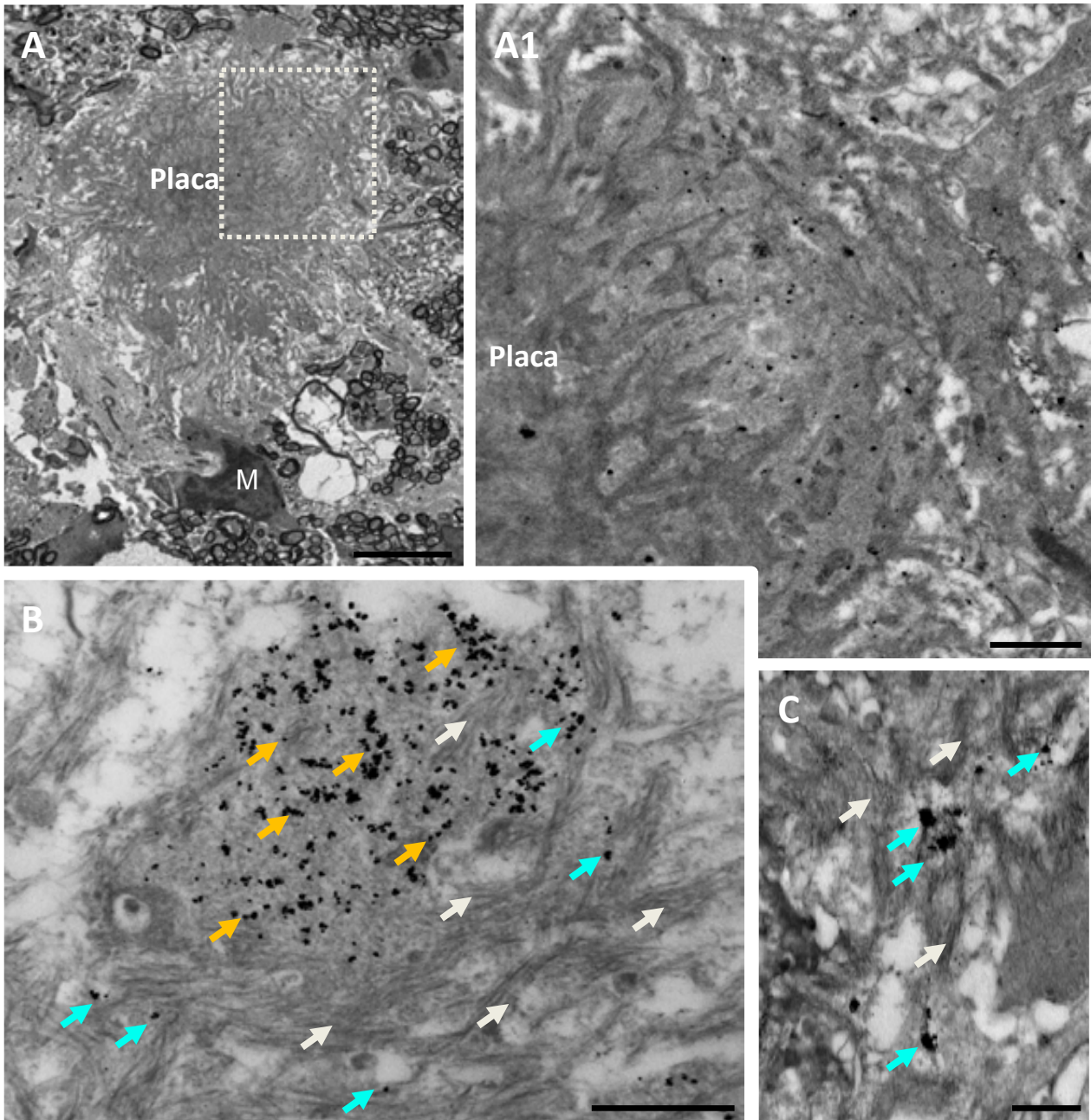


Figura 3.51. Galectina3 se localiza principalmente en el citoplasma de la microglía periplaca y, en menor medida, también se asocia a las fibras amiloides. Inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión para el marcador galectina3. **A**, panorámica de una placa amiloide rodeada por prolongaciones microgliales. **A1**, detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en A. En **B** y **C** se muestran detalles de la estrecha interacción entre el citoplasma microglial gal3-positivo (flechas amarillas) y las fibras amiloides (flechas blancas). Algunas partículas de oro para gal3 (flechas azules) se localizan sobre las fibras amiloides. M: microglía. Barras de escala: 5 μm (A), 1 μm (A1) y 0,5 μm (B-C).

de las placas amiloides, aunque en algunos casos se observó marca específica sobre las fibras amiloides.

En el inmunomarcaje doble a campo claro con gal3 y A β oligomérico se detectó, además de la presencia de microglía periplaca gal3-positiva, una gran acumulación de células gal3-positivas en la fisura hipocampal, siguiendo un patrón concreto que se repetía en todos los animales APP/PS1 analizados tanto a 6 como a 12 meses de edad (Fig. 3.52 A y C). Estos acúmulos en la fisura hipocampal parecen aumentar con la edad, no están asociados a placas amiloides y son más notorios en niveles caudales. Mediante inmunohistoquímica a campo claro para CD45 (microglía activada) en secciones adyacentes de los mismos animales (Fig. 3.52 B y D), se comprobó que estos acúmulos eran también positivos para CD45, tratándose por tanto de microglía activada que expresa una elevada cantidad de gal3. Mediante inmunomarcaje doble con CD45 y gal3 a microscopía láser confocal (Fig. 3.52 E), se corroboró la colocalización de ambos marcadores en estas agrupaciones de células en la zona de la fisura hipocampal. Además, en inmunohistoquímica a campo claro para gal3 en animales WT y APP/PS1 (Fig. 3.53), se comprobó que estos acúmulos en los animales silvestres eran prácticamente inexistentes, presentando escasas células gal3-positivas no solo en la fisura, sino en todo el hipocampo (Fig. 3.53 A-B). En comparación, los animales APP/PS1 tenían una expresión mucho mayor de gal3 en todo el hipocampo y más concretamente en la fisura hipocampal (Fig. 3.53 C-D), sugiriendo que la acumulación de células gal3-positivas en la fisura es una alteración patológica que ocurre en los animales transgénicos.

Otro marcador que se ha relacionado con la agregación de A β es ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). Para estudiar su expresión en el hipocampo del modelo APP/PS1, se realizó inmunofluorescencia triple para Iba1 (microglía), BAM10 (A β) y ASC (Fig. 3.54 A1-A5). Se muestran imágenes de un solo plano focal, así como una reconstrucción en volumen. Se observó que la microglía activada alrededor de las placas amiloides expresa ASC en el cuerpo celular y sus prolongaciones, y que ocurre una alta colocalización entre Iba1 y ASC. No se detectó inmunotinción para este marcador en las placas amiloides. Para determinar la localización de ASC a nivel subcelular, se empleó inmuno-oro con este marcador para microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.54 B). Se observó que la marca se localiza principalmente en el citoplasma microglial, aunque también en el núcleo celular. En cuanto a la relación entre las prolongaciones microgliales ASC-positivas y las placas a MET (Figs. 3.55-3.56), el estudio de la zona de contacto entre las prolongaciones y las fibras amiloides a grandes aumentos reveló que la marca ASC-positiva se encontraba principalmente en el citoplasma microglial. No obstante, se observó en algunos casos marca positiva que se encontraba sobre las fibras amiloides (Fig. 3.56).

En resumen, se ha estudiado, tanto a nivel histológico como a nivel subcelular, la localización de dos proteínas relacionadas con la agregación y compactación de A β : galectina 3 y ASC. Se ha visto que en nuestro modelo APP/PS1 existe una clara asociación de estos dos marcadores, gal3 y ASC, con las células microgliales activadas que rodean las placas amiloides. Sin embargo, a nivel ultraestructural, no se han observado grandes evidencias de que estas proteínas sean secretadas de forma abundante y se acumulen en el core de las placas amiloides en nuestro modelo transgénico.

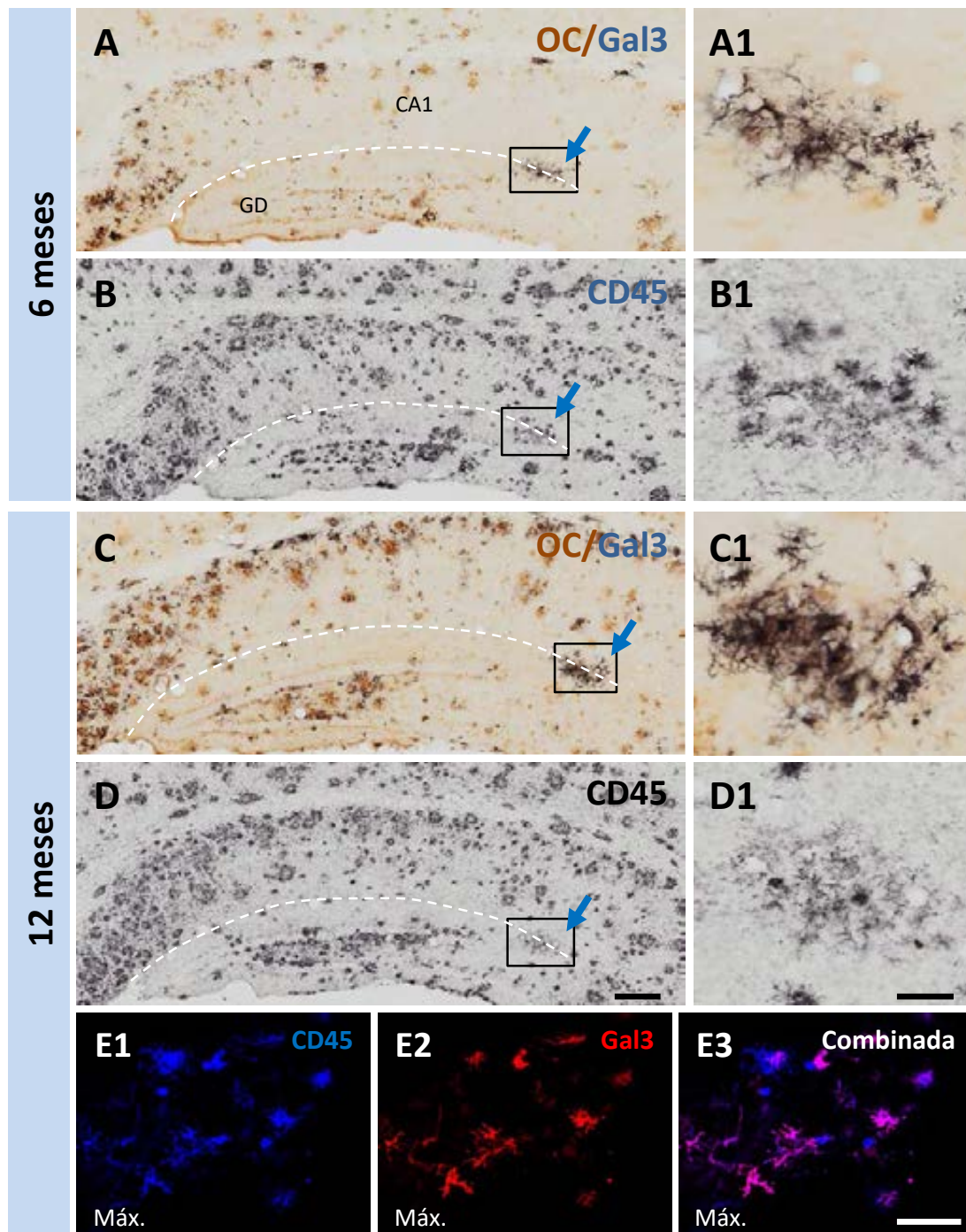


Figura 3.52. Acumulación de células gal3-positivas en la zona de la fisura hipocampal. A y C, inmunohistoquímica doble a campo claro para gal3 (azul-negro) y A β (OC, marrón-anaranjado) en el hipocampo ratones APP/PS1 de 6 meses (A) y 12 meses (C) de edad. A1 y C1, detalles de los acúmulos de células gal3-positivas (zona recuadrada en A y C) de la fisura hipocampal. B y D, inmunohistoquímica a campo claro para CD45 en una sección adyacente de los mismos animales a 6 (B) y 12 meses (D), donde también se observan acúmulos inmunopositivos de microglía activada en la fisura. Se muestran detalles a mayores aumentos en B1 y D1. E, inmunofluorescencia doble para CD45 (microglía activa, azul) y gal3 (rojo) a microscopía confocal, proyecciones máximas de varios planos focales, mostrando colocalización de ambos marcadores en la zona de la fisura. La acumulación de las células gal3-positivas en la fisura parece aumentar con la progresión de la patología. La fisura se delimita con línea discontinua. Barras de escala: 200 μ m (A-D) y 50 μ m (A1-D1 y E1-E3).

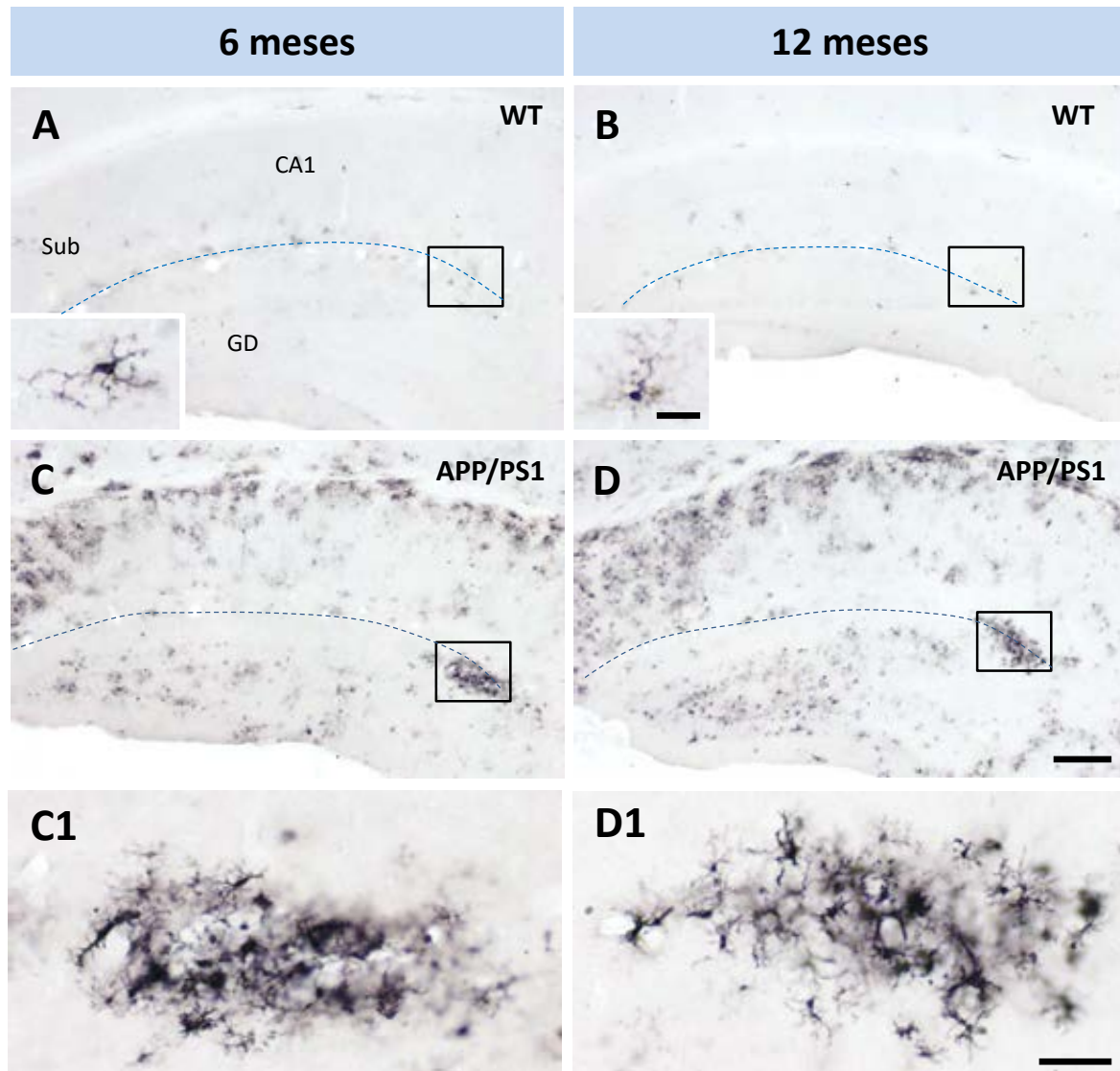


Figura 3.53. La acumulación de microglía gal3-positiva en la fisura hipocampal es una característica patológica de los animales APP/PS1. A-D, inmunohistoquímica a campo claro para gal3 en el hipocampo de animales WT (A y B) y animales APP/PS1 (C y D) de 6 (A y C) y 12 (B y D) meses de edad. En los animales no transgénicos se detectan muy pocas células gal3-positivas en la región de la fisura hipocampal (recuadro en A y B, y detalle de célula marcada en los insertos correspondientes). En los animales APP/PS1 la expresión de gal3 se encuentra muy aumentada por todo el parénquima y en especial en la región de la fisura (recuadros en C y D). **C1** y **D1**, detalles a mayores aumentos de los recuadros en C y D mostrando el acúmulo de microglía gal3-positiva en la fisura a 6 y 12 meses de edad. CA1: región 1 del asta de Ammon; GD: giro dentado; Sub: subículo. La fisura se delimita con una línea discontinua azul. Barras de escala: 200 μ m (A-D), 50 μ m (C1-D1) y 20 μ m (detalles en A y B).

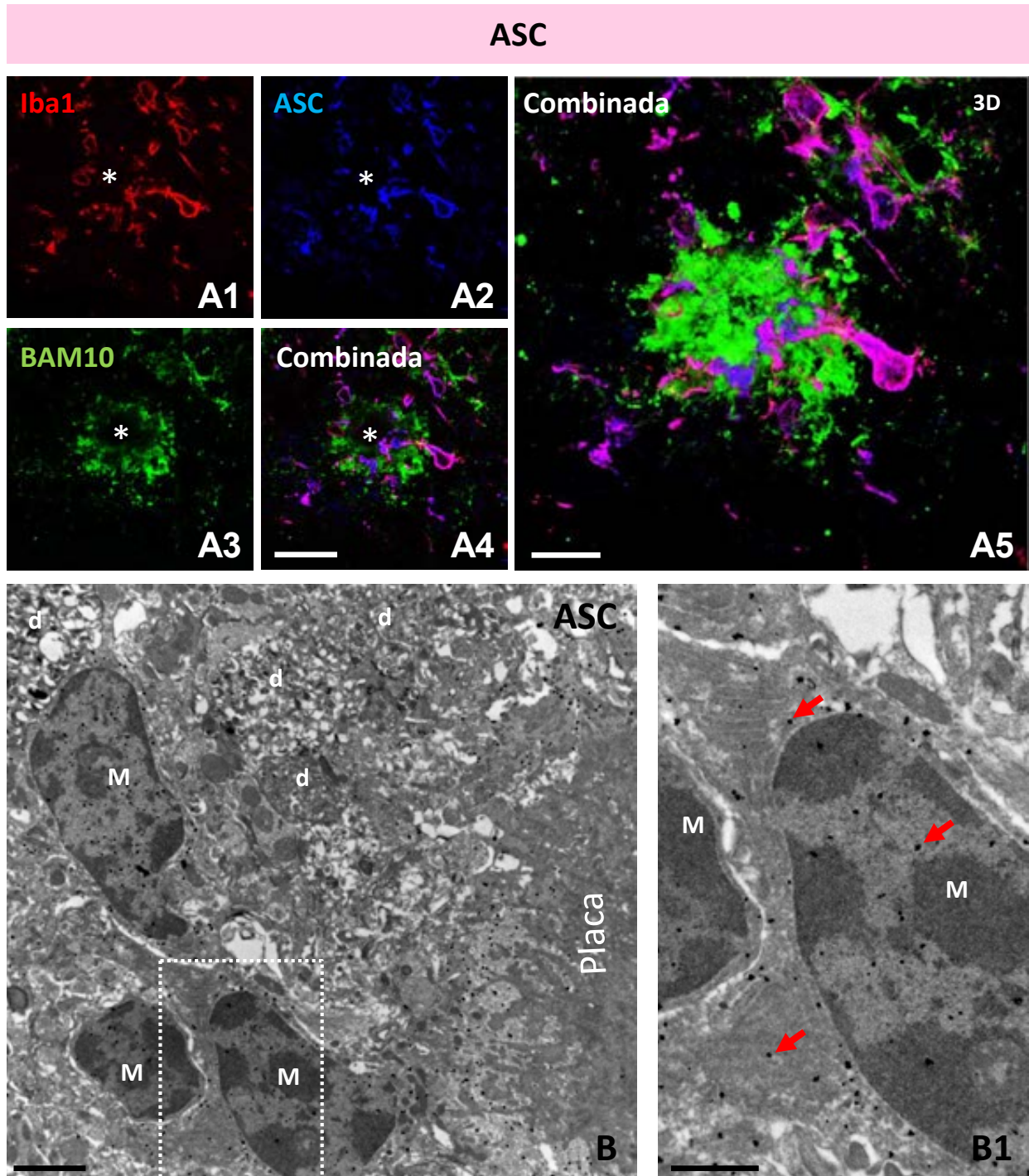


Figura 3.54. La microglía alrededor de las placas amiloides expresa ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). **A1-A5**, inmunofluorescencia triple para Iba1 (rojo), ASC (azul) y A β (BAM10, verde) en el hipocampo de APP/PS1 de 12 meses. Se muestran imágenes de un solo plano focal (A1-A4) y una reconstrucción en 3D a partir de varios Z-stacks (A5). Se observa una alta colocalización entre los marcadores ASC e Iba1. El core de la placa aparece indicado con un asterisco. **B**, inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión para el marcador ASC. **B1**, detalle a mayores aumentos del recuadro en B. Se muestran células microgliales (M) cerca de una placa amiloide. La marca inmunopositiva para ASC (flechas rojas) se encuentra preferentemente en el citoplasma, aunque también se puede apreciar en el núcleo de la microglía. d: neuritas distróficas. Barras de escala: 20 μ m (A1-A4), 10 μ m (A5), 2 μ m (B), 1 μ m (B1).

ASC

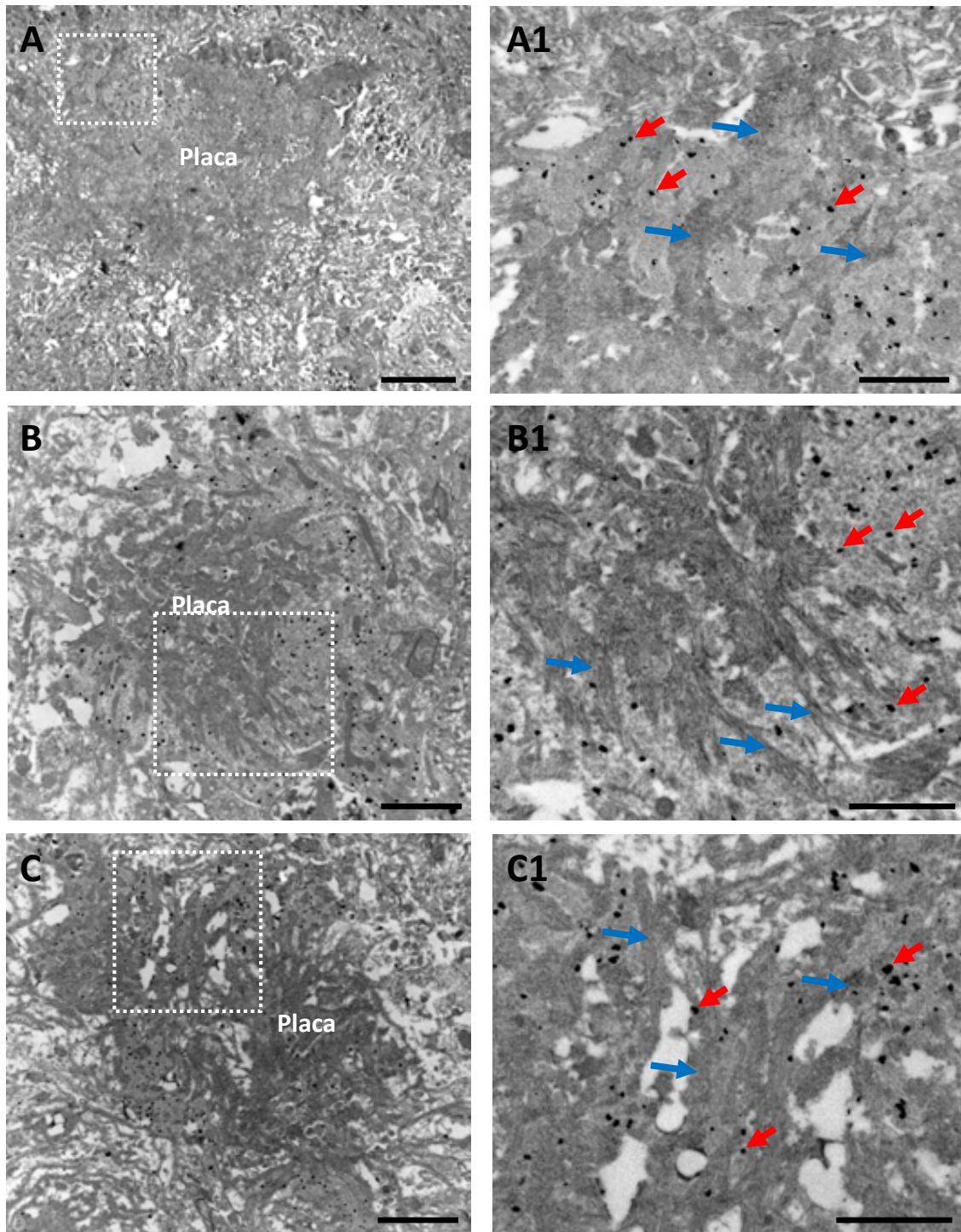


Figura 3.55. Estrecha relación a nivel ultraestructural entre las prolongaciones microgliales ASC-positivas y las fibras amiloides. Se muestran imágenes de inmuno-oro para ASC a microscopía electrónica de transmisión. **A-C**, panorámicas de placas amiloides rodeadas por prolongaciones microgliales ASC-positivas. **A1-C1**, detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas en A-C. La marca para ASC (flechas rojas) se localiza en el citoplasma microglial, próxima a las fibras amiloides (flechas azules). Barras de escala: 5 μm (A), 2 μm (B y C) y 1 μm (A1, B1 y C1).

ASC

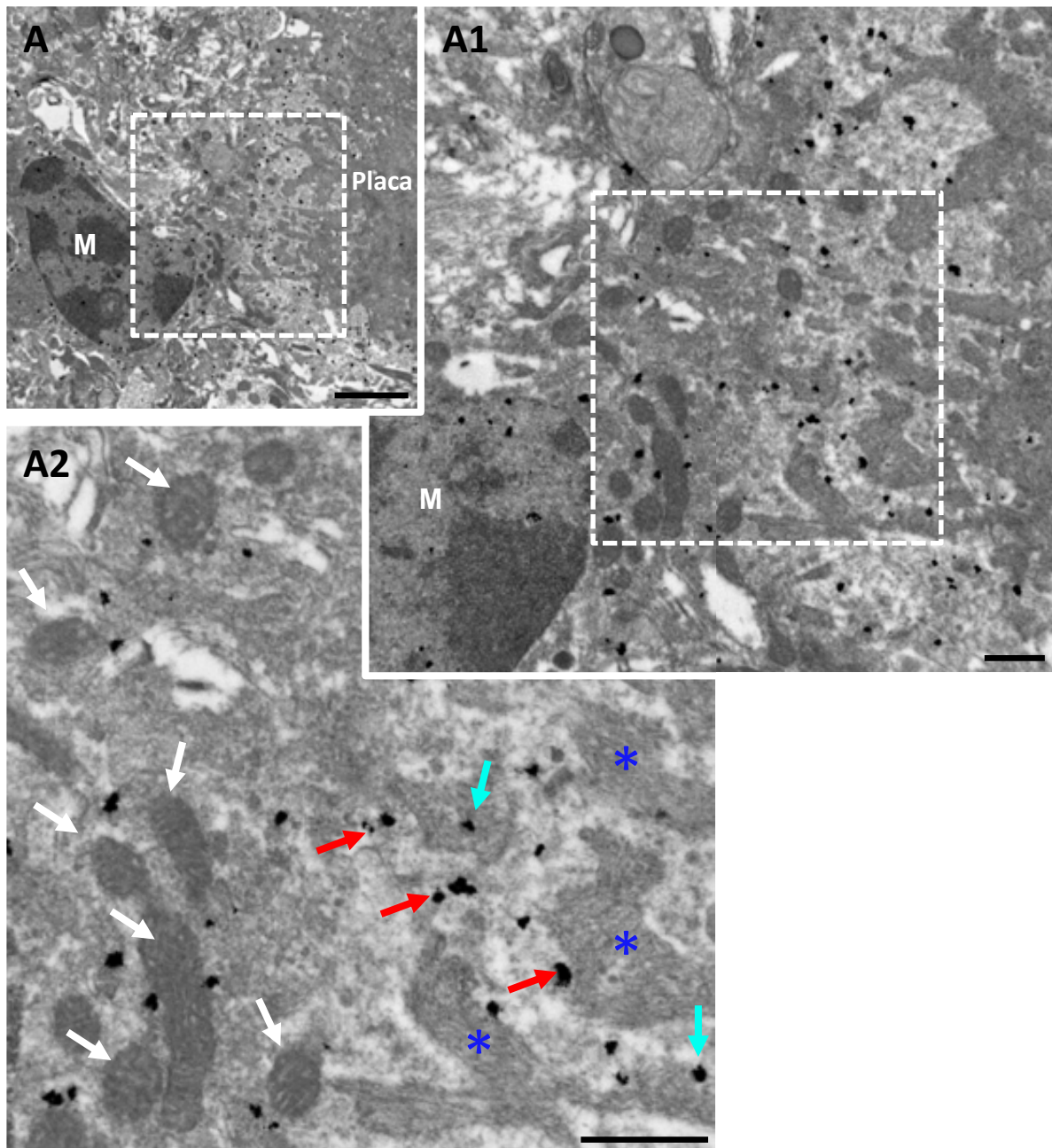


Figura 3.56. La inmunorreactividad para ASC se localiza preferentemente en el citoplasma microglial que rodea y envuelve a las placas amiloides. Inmuno-oro para ASC a microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de APP/PS1. **A**, panorámica de una placa amiloide con microglía (M) ASC-positiva asociada. **A1**, detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en A. **A2**, detalle de la zona recuadrada en A1. La marca inmunopositiva para ASC (flechas rojas) se localiza preferentemente en el citoplasma microglial muy cercana a las fibras amiloides (asteriscos), aunque a veces es posible observar marca asociada a las fibras (flechas azules). Flechas blancas: mitocondrias. Barras de escala: 2 μ m (A) y 0,5 μ m (A1-A2).

3.2.6. LA MICROGLÍA ACTIVADA TREM2-POSITIVA RODEA ESPECÍFICAMENTE EL CORE DE LAS PLACAS AMILOIDES

Como se ha observado previamente, en nuestro modelo APP/PS1 ocurre una marcada activación microglial alrededor de las placas amiloides. Esta microglía activada se caracteriza por la sobreexpresión de una serie de genes de la firma microglial DAM, entre los cuales se encuentra *TREM2*. Nuestro estudio transcriptómico en la microglía activada reveló un aumento de casi 100 veces en la expresión de *TREM2* con la edad. Dada la gran importancia de *TREM2* en la activación microglial, se estudió la relación entre este marcador microglial y las placas amiloides en el modelo APP/PS1.

Mediante inmunohistoquímica simple a campo claro con anti-TREM2 (Fig. 3.57 A), se observó que ocurre un aumento en la cantidad de microglía TREM2-positiva con la edad en el hipocampo del modelo APP/PS1. La relación entre las placas amiloides y la microglía TREM2-positiva se analizó mediante inmunohistoquímica doble a campo claro para A β oligomérico prefibrilar (OC) y TREM2 (Figs. 3.57 B y 3.58 A). Además de darse un aumento para ambos marcadores con la edad (Fig. 3.57 B1-B2), la microglía TREM2-positiva se encuentra asociada a las placas amiloides de forma muy estrecha, enviando sus prolongaciones hacia el core de las placas y formando un anillo alrededor de este (Figs. 3.57 B3-B8 y 3.58 A1-A5). En algunos casos se observaron alteraciones estructurales en la microglía, como engrosamientos esféricos en mitad de sus prolongaciones y en la zona de contacto con el core de la placa, sugiriendo la existencia de distrofias microgliales (Figs. 3.57 B3, B5 y 3.58 A1, A2). Las placas pequeñas normalmente tienen una/dos células TREM2-positivas asociadas, mientras que al crecer en tamaño tienen un mayor número de células a su alrededor. Mediante inmunofluorescencia doble a microscopía confocal para TREM2 y CD45 (microglía activada) (Figs. 3.57 C y 3.58 B), se corroboró que las células TREM2-positivas asociadas a placas son microglía en estado activado. Aunque ocurre una alta colocalización entre ambos marcadores de activación microglial, el inmunomarcaje para TREM2 se encuentra más próximo al core de la placa que la marca para CD45.

Tras comprobar cualitativamente que ocurre un aumento con la progresión de la patología en la cantidad de células TREM2-positivas en el hipocampo del modelo APP/PS1 (Fig. 3.59 A-D), se realizó un estudio cuantitativo del área inmunomarcada para TREM2 en la región CA1 (Fig. 3.59 E). Se obtuvo un aumento significativo entre los 4 y los 12 meses de edad ($12,64 \pm 0,90$ veces, $p < 0,001$) y que no progresa más a los 18 meses ($F(3,8) = 21,58$, $P = 0,0003$). Al comparar la evolución de la patología amiloide y la activación microglial para TREM2 (Fig. 3.59 F), se observó que las áreas ocupadas por las placas amiloides (OC-positivas) y la microglía activada (TREM2-positiva) aumentaban a la par entre los 4 y los 12 meses, pero a los 18 meses la carga microglial se estabilizaba, mientras que la carga amiloide seguía aumentando. Al realizar un estudio de correlación (Fig. 3.59 G), se obtuvo que existía una correlación positiva entre la patología amiloide, medida como el área OC-positiva, y la activación microglial, medida como el área TREM2-positiva, en la región CA1 de los mismos animales APP/PS1 de 4, 6, 12 y 18 meses ($r = 0,7642$, $P = 0,0038$). Además, se observó a nivel ultraestructural la relación entre las prolongaciones microgliales TREM2-positivas y las placas amiloides. Para ello se empleó inmuno-oro para TREM2 a microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.60). TREM2

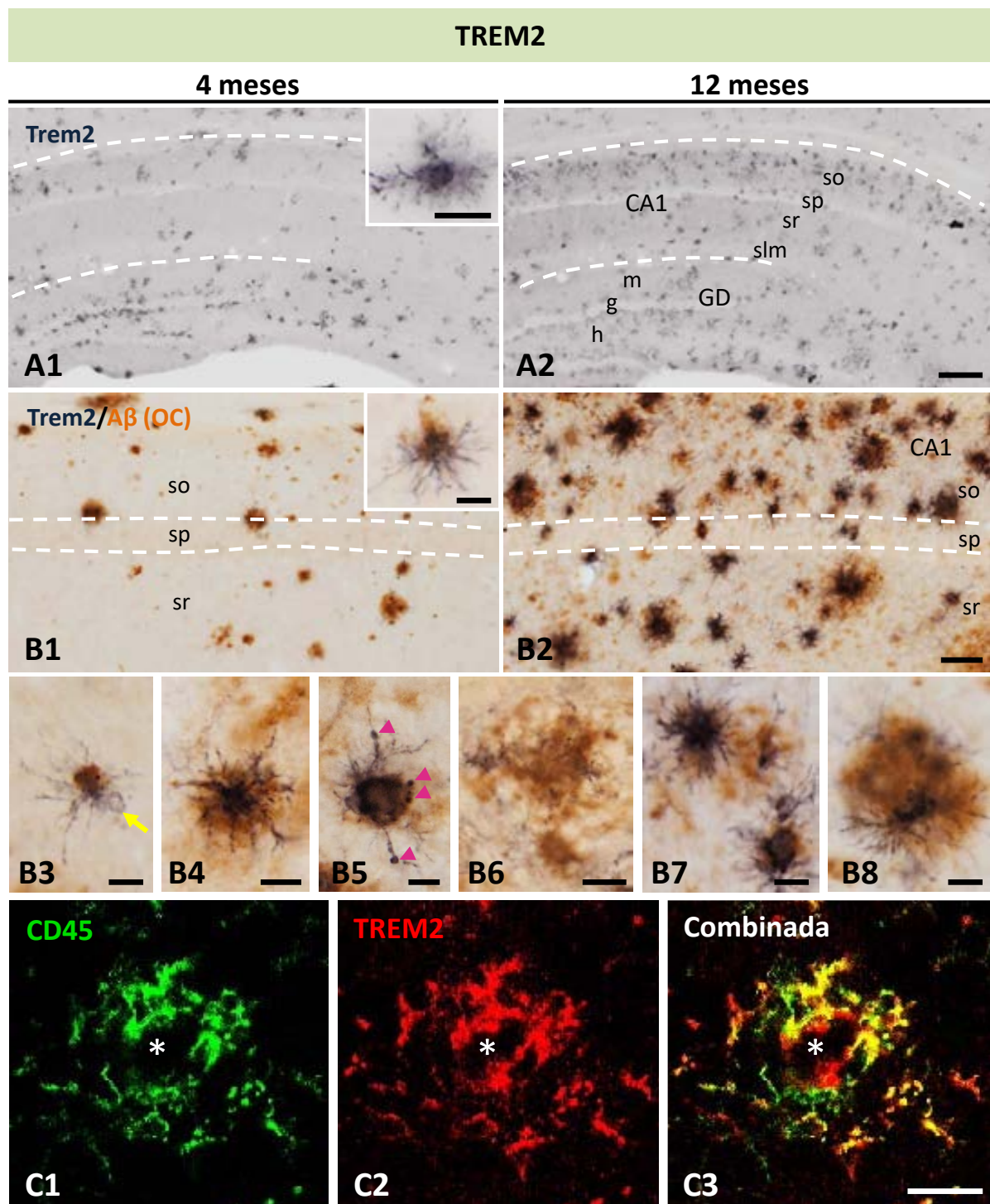


Figura 3.57. La microglía asociada a placa es TREM2-positiva y aumenta con la patología amiloide en el hipocampo del modelo APP/PS1. **A**, inmunohistoquímica a campo claro para TREM2 en ratones APP/PS1 de 4 (A1) y 12 (A2) meses de edad. **B**, inmunohistoquímica doble a campo claro para TREM2 (azul-negro) y Aβ (OC, en marrón-anaranjado) en la región CA1 a 4 (B1) y 12 (B2) meses, mostrando el aumento de microglía TREM2-positiva con la edad. **B3-B8**, las prolongaciones TREM2-positivas llegan hasta el centro de las placas y algunas presentan estructuras distróficas (flecha amarilla y puntas de flecha en rosa). **C**, inmunofluorescencia a microscopía confocal para CD45 (C1, verde) y TREM2 (C2, rojo) mostrando la colocalización (C3) entre ambos marcadores en la microglía alrededor del core de las placas (asterisco). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado, so: estrato oriens, sp: estrato piramidal, sr: estrato radiado, slm: estrato lacunosomolecular, m: capa molecular del giro, g: capa granular, h: hilio. Barras de escala: 200 μm (A1-A2), 50 μm (B1-B2), 20 μm (B6, C1-C3 e inserto en A1), 10 μm (B3, B4, B5, B7, B8 e inserto en B1).

TREM2/A β (OC)

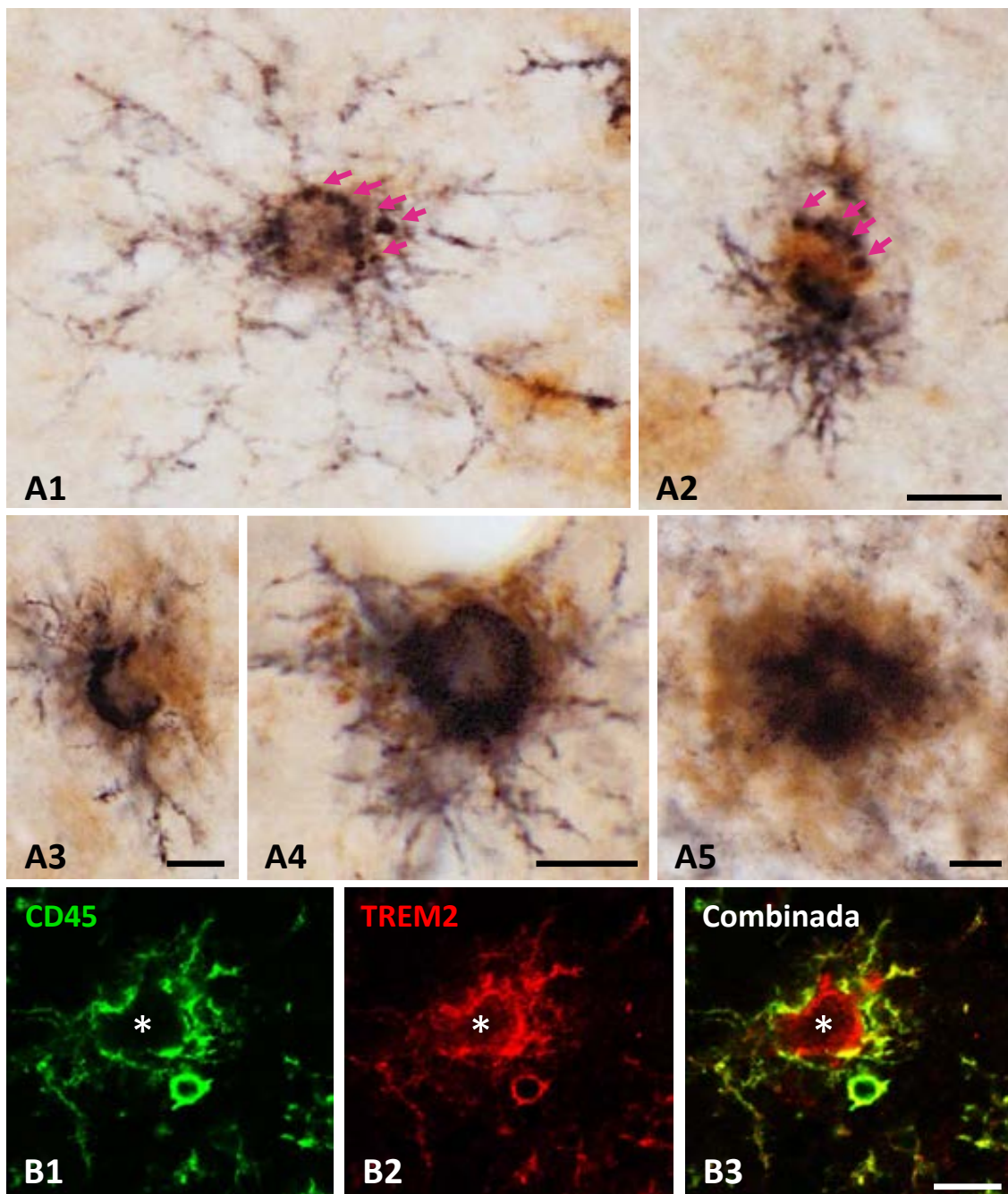


Figura 3.58. Las prolongaciones microgliales TREM2-positivas forman un anillo que rodea el core de las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1. **A**, inmunohistoquímica doble a campo claro para TREM2 (azul-negro) y A β (OC, en marrón-anaranjado), se muestran detalles de placas con microglía TREM2-positiva asociada. Las placas pequeñas presentaban una o varias células TREM2-positivas (A1-A3), hasta formarse acúmulos mayores de células en placas de mayor tamaño (A4 y A5). La microglía presentaba alteraciones morfológicas, con engrosamientos en la zona de contacto con la placa (flechas en rosa) formando una estructura de aspecto anular. **B**, inmunofluorescencia a microscopía láser confocal para CD45 (verde) y TREM2 (rojo) en APP/PS1, con la marca TREM2 más próxima al core (indicado con asterisco) que la marca CD45-positiva. Barras de escala: 10 μ m.

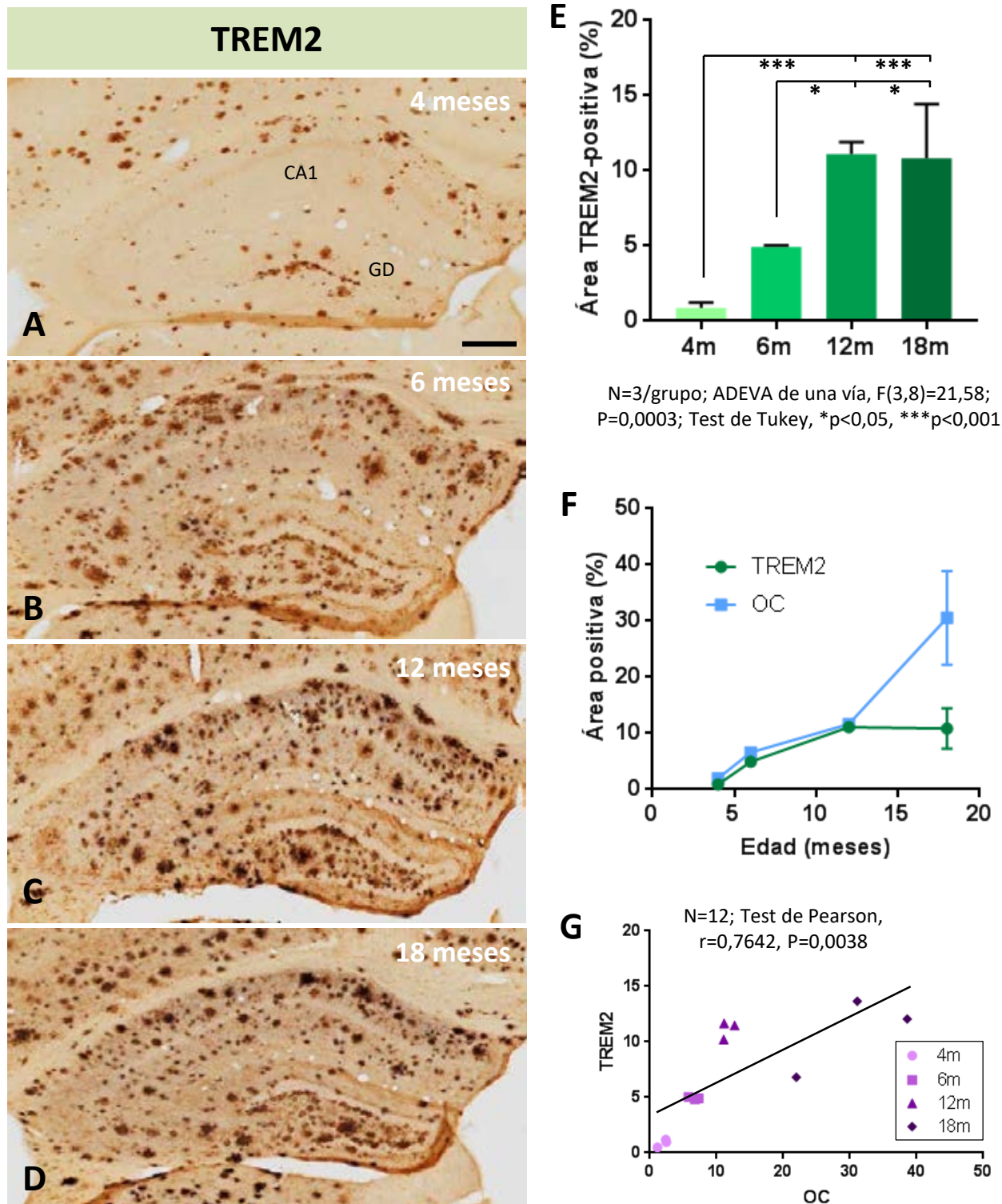


Figura 3.59. Aumento significativo de la carga microglial TREM2-positiva con la progresión de la patología amiloide en el hipocampo de ratones APP/PS1. A-D, inmunohistoquímica doble a campo claro para TREM2 (azul-negro) y A β (OC, en marrón-anaranjado) en el hipocampo ratones APP/PS1 de 4 (A), 6 (B), 12 (C) y 18 meses (D). E, estudio cuantitativo del área inmunorreactiva para TREM2 en la región CA1. F, análisis comparativo de la progresión de la carga microglial para TREM2 y de la patología amiloide (OC, A β oligomérico). G, correlación entre la carga microglial y la carga amiloide. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en cada gráfica. CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado. Barra de escala: 200 μ m.

se localizaba en la membrana de las prolongaciones que contactan con las fibras amiloides. También se detectó marca TREM2 positiva en el citoplasma microglial.

Todos estos resultados sugieren que la microglía activada TREM2-positiva que rodea a las placas participa en la envoltura/aislamiento y/o compactación de las placas amiloides formando un anillo de prolongaciones alrededor del núcleo denso o core de las placas. Al igual que lo observado con el marcador CD45, la microglía periplaca TREM2-positiva frena su expansión a los 12 meses a pesar del progresivo aumento de las placas.

3.2.7. EL RECUBRIMIENTO MICROGLIAL DE LAS PLACAS AMILOIDES DISMINUYE CON LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA

Al igual que con el inmunomarcaje para TREM2, utilizando inmunofluorescencia a microscopía confocal para Iba1 (microglía total) con BAM10 (A β) (Fig. 3.61 A1-A3) o con 4G8 (A β) (Fig. 3.61 B1-B3), se visualizaron prolongaciones microgliales introduciéndose hacia el interior de las placas y envolviendo el core mediante un anillo. Por otra parte, la relación entre las placas amiloides, la microglía y las neuritas distróficas se estudió empleando inmunofluorescencia triple para Iba1 (microglía), APP (distrófias) y 4G8 (A β) (Fig. 3.62). En este experimento se observó que las placas pequeñas normalmente tienen una mayor envoltura microglial y menor cantidad de distrófias a su alrededor que las placas grandes. La microglía parece tener un papel fundamental en la envoltura y aislamiento de las placas amiloides, por lo cual, el deterioro cognitivo que ocurre con la progresión de la EA podría deberse a cambios funcionales en este papel de barrera de la microglía. En este sentido, la microglía periplaca podría pasar de ser efectiva envolviendo las placas en fases iniciales de la patología a ser disfuncional en fases más avanzadas provocando un aumento en la toxicidad de las placas. Para detectar una posible degeneración microglial con la progresión de la patología en nuestro modelo APP/PS1, se ha empleado el marcador ferritina. La ferritina se sobreexpresa en la microglía senescente/degenerativa debido a estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo del hierro. Mediante inmunohistoquímica a campo claro empleando anti-ferritina (Fig. 3.63 A-B), se apreció un aumento cualitativo en la expresión de ferritina en el hipocampo del modelo APP/PS1 entre los 6 y los 12 meses. Empleando inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para CD45 (microglía activada) y ferritina (Fig. 3.63 C), se observó que solo una parte de la microglía activada que rodea a las placas es positiva para ferritina y, por tanto, esta podría presentar un estado senescente. Al realizar la cuantificación del área ocupada por el inmunomarcaje para ferritina (Fig. 3.63 D), se obtuvo un aumento significativo entre los 6 y los 12 meses en la región CA1 hipocampal ($2,68 \pm 0,62$ veces, T-test, $P=0,0094$).

A microscopía electrónica de transmisión empleando inmuno-oro para los marcadores Iba1, CD45 y ferritina (Fig. 3.64), se aprecia cómo la microglía se asocia íntimamente a las placas amiloides, de modo que sus prolongaciones se entremezclan con las fibras amiloides envolviéndolas totalmente. Estas prolongaciones microgliales alrededor de las placas presentan marca positiva para Iba1, corroborando su naturaleza microglial, para CD45, indicando que se trata de microglía activada, y para ferritina, sugiriendo que la microglía podría estar entrando en proceso degenerativo.

TREM2

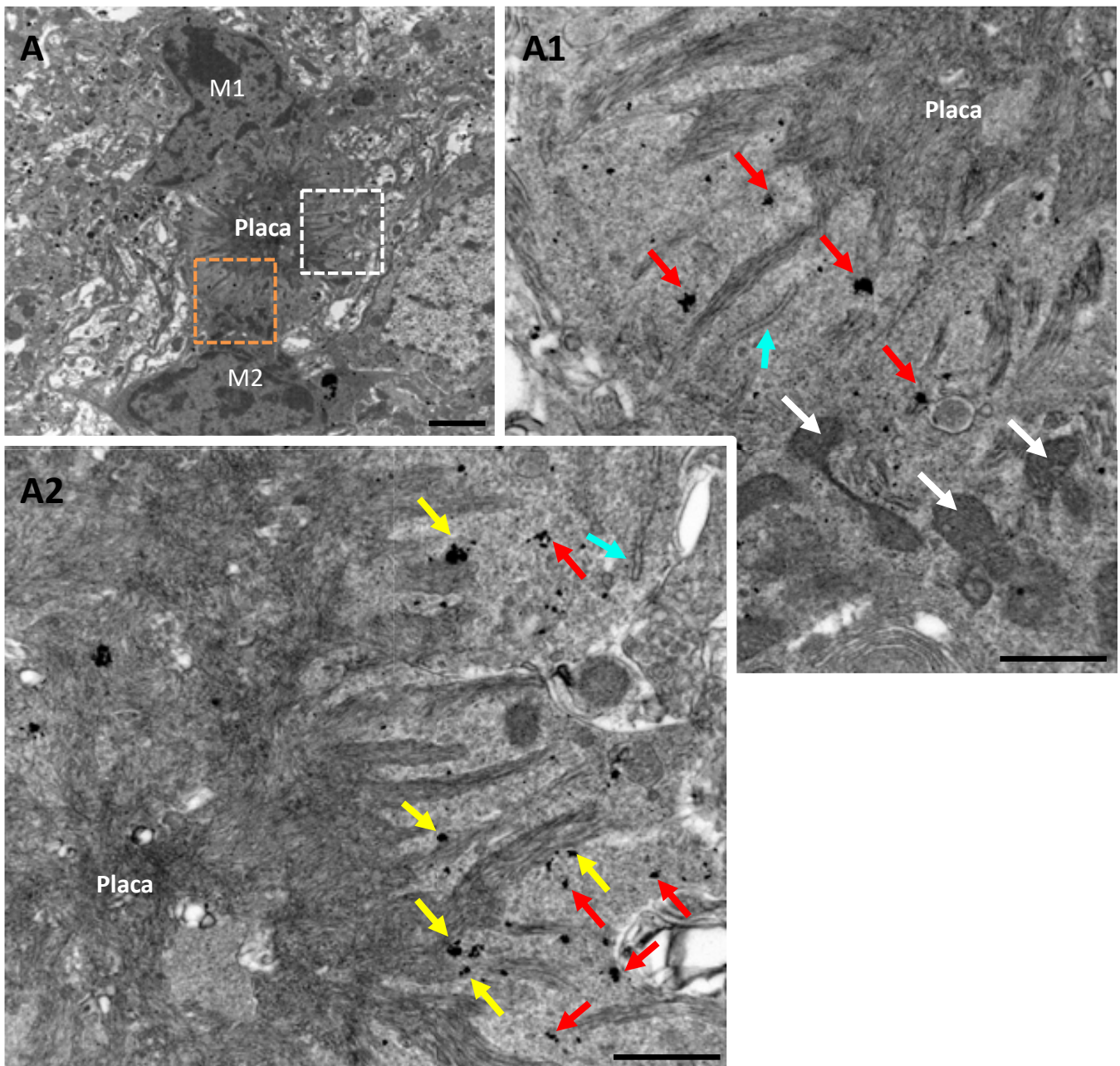


Figura 3.60. TREM2 se localiza en el citoplasma microglial en contacto con las fibras amiloides. Inmuno-oro para TREM2 a microscopía electrónica de transmisión. **A**, panorámica de una placa amiloide con dos células microgliales (M1 y M2). **A1**, detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en naranja en A. **A2**, detalle de la zona recuadrada en blanco en A. La microglía que envuelve las placas amiloides posee inmunomarcaje positivo para TREM2, tanto en el citoplasma (flechas rojas) como en la membrana microglial en contacto con las fibras amiloides (flechas amarillas). Flechas blancas: mitocondrias; flechas azules: retículo endoplasmático rugoso. Barras de escala: 2 μm (A) y 0,5 μm (A1-A2).

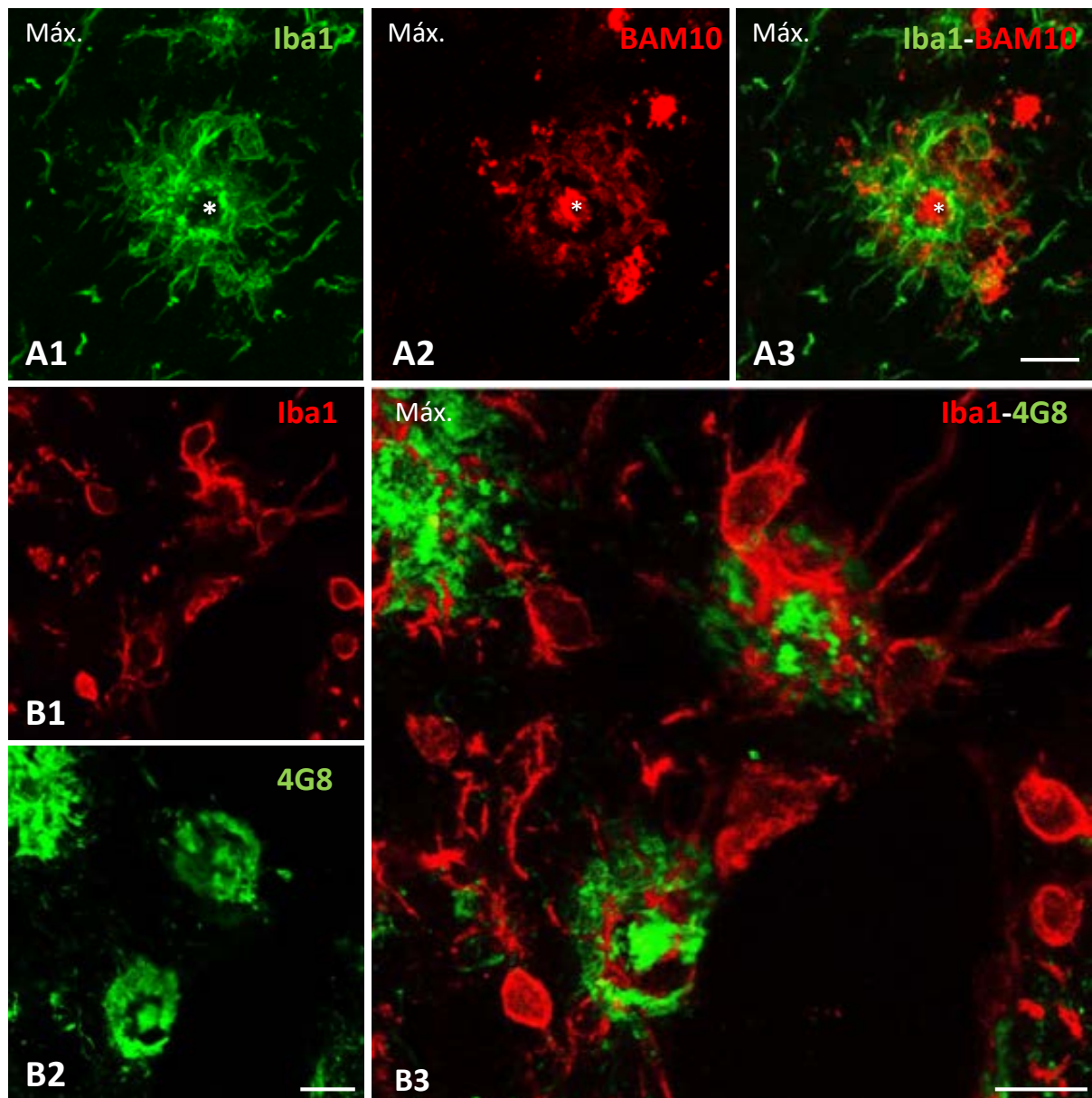


Figura 3.61. Las células microgliales envuelven y aíslan el core de las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1. A, inmunofluorescencia doble para Iba1 (A1: verde, microglía) y BAM10 (A2: rojo, A β) a microscopía láser confocal (proyecciones máximas). Se muestra una placa amiloide cuyo core (asterisco) está totalmente rodeado por prolongaciones microgliales. **B**, inmunofluorescencia doble a microscopía laser confocal (B1 y B2 imágenes de planos focales) empleando anti-Iba1 (B1: rojo, microglía), y 4G8 (B2: verde, A β). En B3 se muestra la proyección máxima a partir de varios planos focales. La microglía se introduce entre el halo para envolver al core. Barras de escala: 10 μ m.

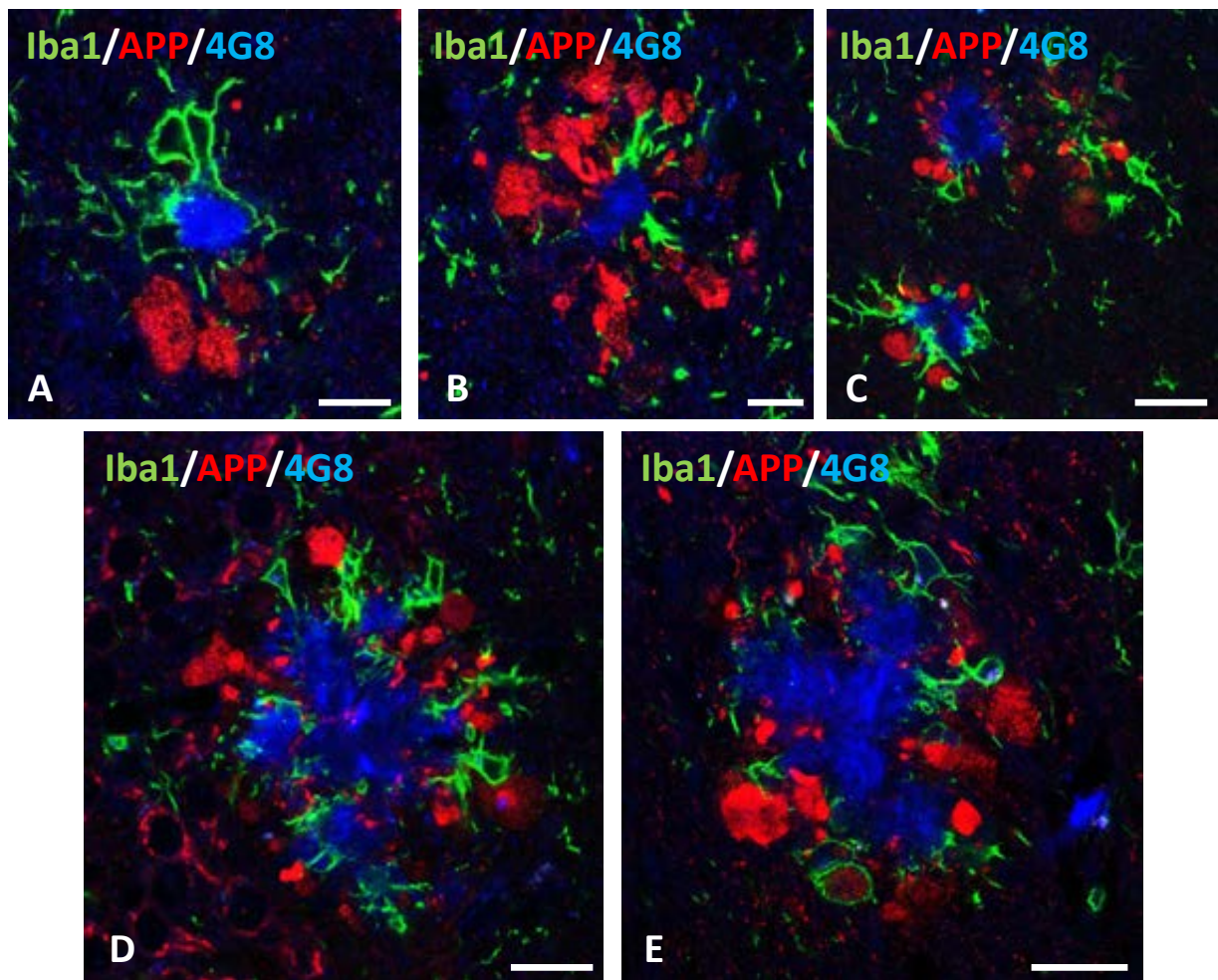
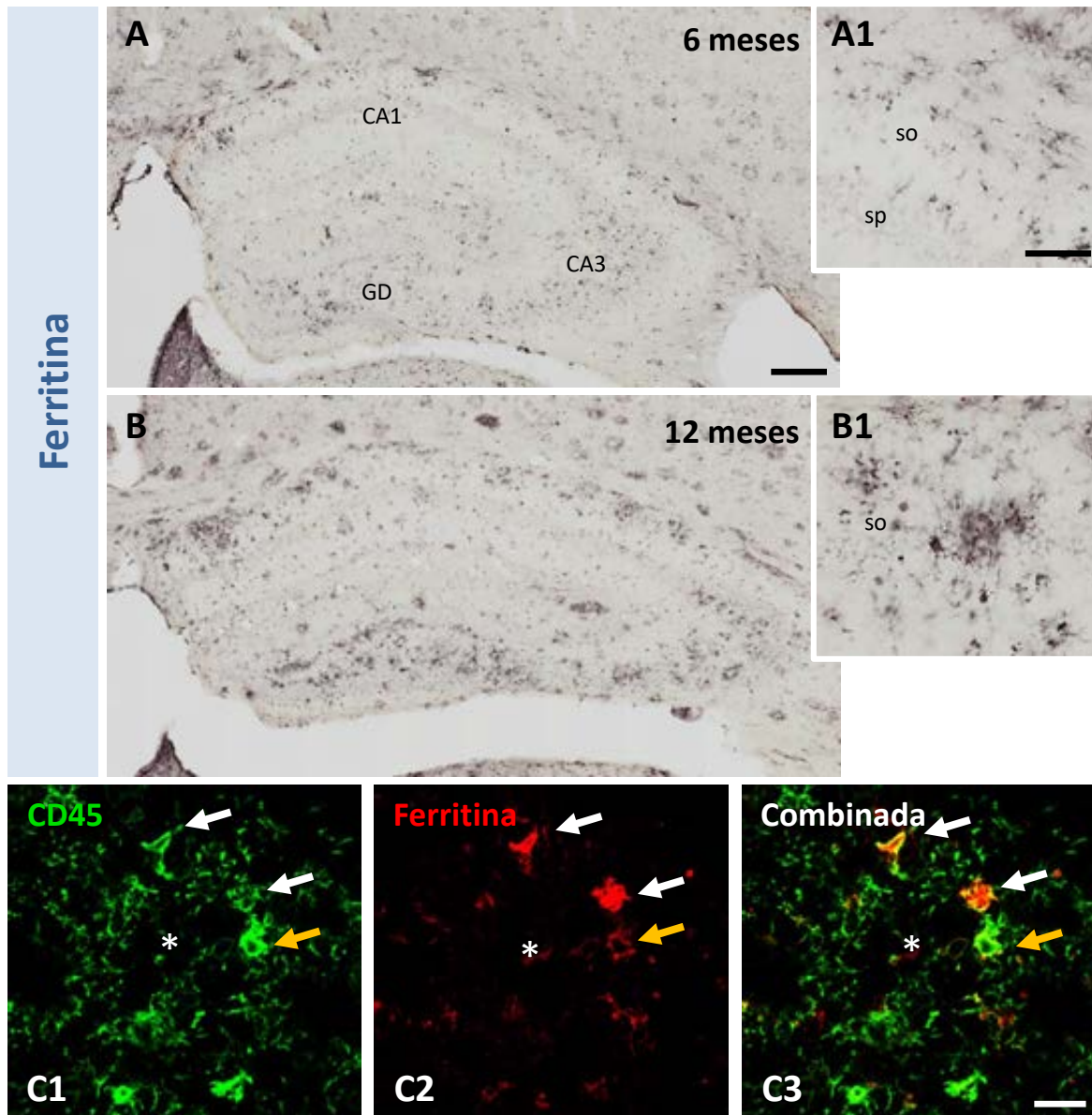
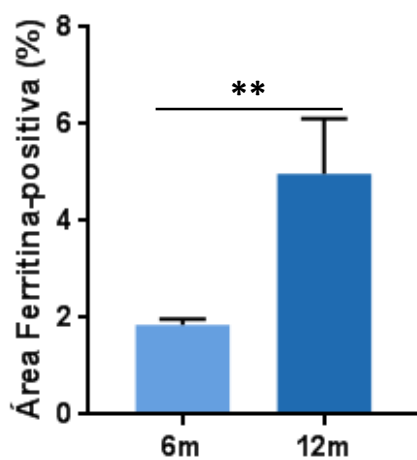


Figura 3.62. Las placas amiloides grandes tienen menor envoltura microglial y una mayor cantidad de **distrofias** a su alrededor. Inmunofluorescencia triple a microscopía láser confocal (imágenes de un solo plano focal) empleando anti-Iba1 (verde, microglía), anti-APP (rojo, distrofias) y 4G8 (azul, Aβ). Se muestran imágenes de placas amiloides de diversos tamaños (A-E). D y E son placas grandes. Barras de escala: 20 μm (C-E) y 10 μm (A-B).



D



N= 3/edad; t-test; P=0,0094; **p<0,01

Figura 3.63. La expresión de ferritina aumenta con la progresión de la patología en el hipocampo del modelo APP/PS1. **A** y **B**, inmunohistoquímica a campo claro para ferritina en animales APP/PS1 de 6 (**A**) y 12 (**B**) meses de edad. Se muestran detalles de mayores aumentos en **A1** y **B1**. **C**, inmunofluorescencia doble a microscopía confocal en APP/PS1 de 12 meses para CD45 (**C1**: verde) y ferritina (**C2**: rojo). Las flechas blancas indican células CD45-positivas con fuerte inmunotinción para ferritina, mientras la flecha naranja indica otra con baja expresión de ferritina. El asterisco indica zona ocupada por una placa amiloide. **D**, análisis cuantitativo del área inmunomarcada para ferritina en CA1 a 6 y 12 meses. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en la gráfica. CA1-3: regiones 1 y 3 del asta de Ammon, GD: giro dentado, so: estrato oriens, sp: estrato piramidal. Barras de escala: 200 μ m (**A-B**), 50 μ m (**A1-B1**) y 20 μ m (**C1-C3**).

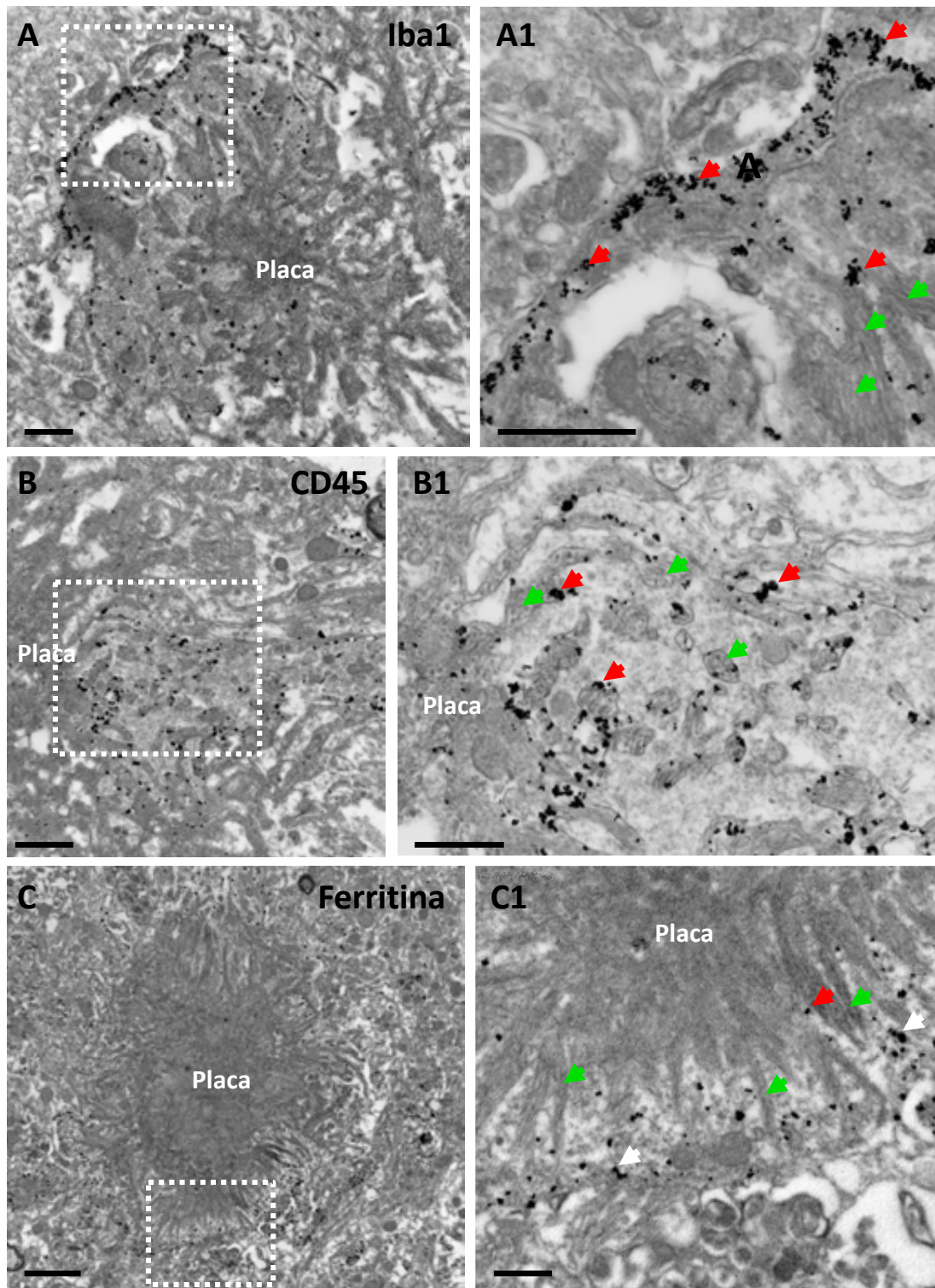


Figura 3.64. Visualización a microscopía electrónica de transmisión de la envoltura microglial periplaca. Inmuno-oro para distintos marcadores microgliales (**A**: Iba1, **B**: CD45, **C**: ferritina) mostrando la estrecha relación entre las placas amiloides y las prolongaciones microgliales. En los detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas (**A1**, **B1**, **C1**) se muestra cómo el citoplasma microglial se entremezcla entre las fibras amiloides. El citoplasma microglial es menos electrodensito que las fibras amiloides. Flechas rojas: inmunomarcaje, flechas verdes: fibras amiloides. Barras de escala: 2 μm (C), 1 μm (B) y 0,5 μm (A, A1, B1, C1).

Al emplear un inmunomarcaje doble a campo claro con ferritina y CD45 (microglía activada) en el hipocampo del modelo APP/PS1 (Fig. 3.65), se observó de forma cualitativa que en la envoltura microglial alrededor de las placas ocurre un aumento en la cantidad de ferritina entre los 6 y los 12 meses. Mediante marcaje triple para microscopía confocal empleando Tioflavina-S, anti-CD45 y anti-ferritina (Fig. 3.66), se observó también un aumento cualitativo en la cantidad de inmunorreactividad para ferritina alrededor de las placas con la edad (se muestran imágenes de proyecciones máximas a partir de varios planos focales). A partir de este triple marcaje TioS/CD45/ferritina, en cada placa amiloide se midió la envoltura periplaca para CD45 y ferritina empleando imágenes de *z-stacks* tomadas a microscopía confocal. La carga periplaca es el volumen ocupado por la marca inmunopositiva (CD45 o ferritina) con respecto al volumen total de la placa y su halo (core y corona microglial). Este análisis reveló que ocurrían cambios en la envoltura microglial con la progresión de la patología en la región CA1 del modelo APP/PS1 (Fig. 3.67). Entre los 6 y los 12 meses ocurría una disminución de la carga periplaca para CD45 (U de Mann Whitney, $P=0.0167$) (Fig. 3.67 A), mientras que en estas mismas placas ocurría un aumento de la carga periplaca para ferritina (U de Mann Whitney, $P<0,0001$) (Fig. 3.67 B). Además, se calculó la cantidad relativa de volumen ferritina-positivo con respecto a CD45 alrededor de cada placa (ratio volumen ferritina+/CD45+), obteniéndose un aumento significativo en la proporción de ferritina con respecto a CD45 con la edad (U de Mann Whitney, $P<0,0001$) (Fig. 3.67 C). Por tanto, a edades avanzadas, las placas del hipocampo del modelo APP/PS1 están menos recubiertas por microglía CD45-positiva (activada) y más recubiertas por microglía ferritina-positiva (degenerativa).

En este estudio del recubrimiento microglial periplaca, al clasificar las placas amiloides por rangos según el tamaño de su core ($<500 \mu\text{m}^3$, $500\text{-}1000 \mu\text{m}^3$, $>1000 \mu\text{m}^3$) (Fig. 3.68), se obtuvo que ni la carga periplaca para CD45 (Fig. 3.68 A) ni para ferritina (Fig. 3.68 B) variaban significativamente con el tamaño de las placas. Se observó que, al clasificar las placas por rangos de tamaño, la envoltura CD45-positiva tendía a ser mayor a los 6 meses que a los 12 meses, siendo este cambio significativo en el caso de las placas pequeñas ($<500 \mu\text{m}^3$: $p<0,05$) (Fig. 3.68 A). El recubrimiento ferritina-positivo aumentaba con la edad de forma significativa en las placas de todos los rangos de tamaño ($<500 \mu\text{m}^3$ y $>1000 \mu\text{m}^3$: $p<0,01$; $500\text{-}1000 \mu\text{m}^3$: $p<0,05$) (Fig. 3.68 B). Por tanto, las placas más grandes no tienen un mayor recubrimiento microglial que las placas pequeñas, es decir, el core de la placa crece, pero el aislamiento por parte de la microglía no aumenta. De hecho, en el triple marcaje TioS/CD45/ferritina a microscopía confocal, se observó que las placas de tamaño pequeño estaban aparentemente más recubiertas por la microglía que las placas de gran tamaño, ocurriendo esto tanto a 6 meses (Fig. 3.69 A-B) como a 12 meses (Fig. 3.69 C-D). En concreto, las placas de tamaño pequeño, marcadas con Tioflavina-S, en ocasiones están totalmente envueltas por las prolongaciones de la microglía, marcada con CD45 y con ferritina, tal y como se muestra en las vistas ortogonales a partir de *Z-stacks* obtenidas mediante microscopía láser confocal (Fig. 3.70). Al clasificar las placas amiloides en rangos de tamaño ($<500 \mu\text{m}^3$, $500\text{-}1000 \mu\text{m}^3$, $>1000 \mu\text{m}^3$) y analizar la cantidad relativa de recubrimiento CD45-positivo con respecto al volumen del core (ratio volumen CD45/TioS), se obtuvo que las placas grandes tenían una menor proporción de recubrimiento CD45-positivo que las placas pequeñas, tanto a 6 meses como a 12 meses ($P<0,0001$) (Fig. 3.71 A). Al estudiar la cantidad relativa de envoltura ferritina-positiva en función del volumen del core (ratio volumen ferritina/TioS), se observó también

CD45/Ferritina

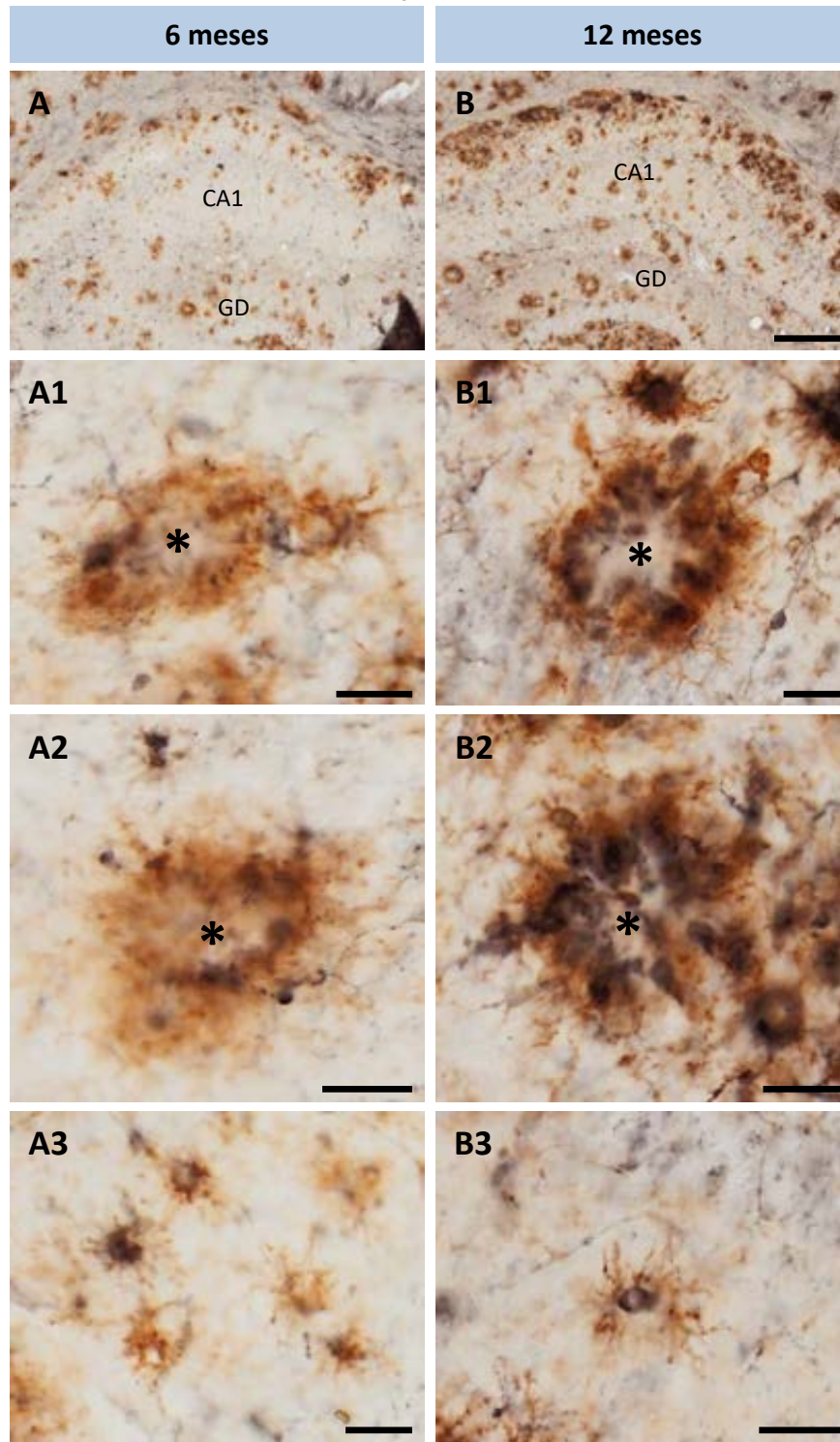


Figura 3.65. Aumento de la cantidad de células ferritina-positivas asociadas a las placas amiloides en el modelo APP/PS1 a medida que progresa la patología. Inmunohistoquímica doble a campo claro para ferritina (azul-negro) y CD45 (microglía activada, en marrón-anaranjado) en el hipocampo ratones APP/PS1 de 6 (**A**) y 12 meses (**B**) de edad. Se muestran detalles de diferentes acúmulos de microglía con expresión de ferritina (placas amiloides indicadas con asterisco) en CA1 de animales de 6 (**A1-A3**) y 12 (**B1-B3**) meses de edad. CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado. Barras de escala: 200 μ m (A-B) y 20 μ m (A1-A3, B1-B3).

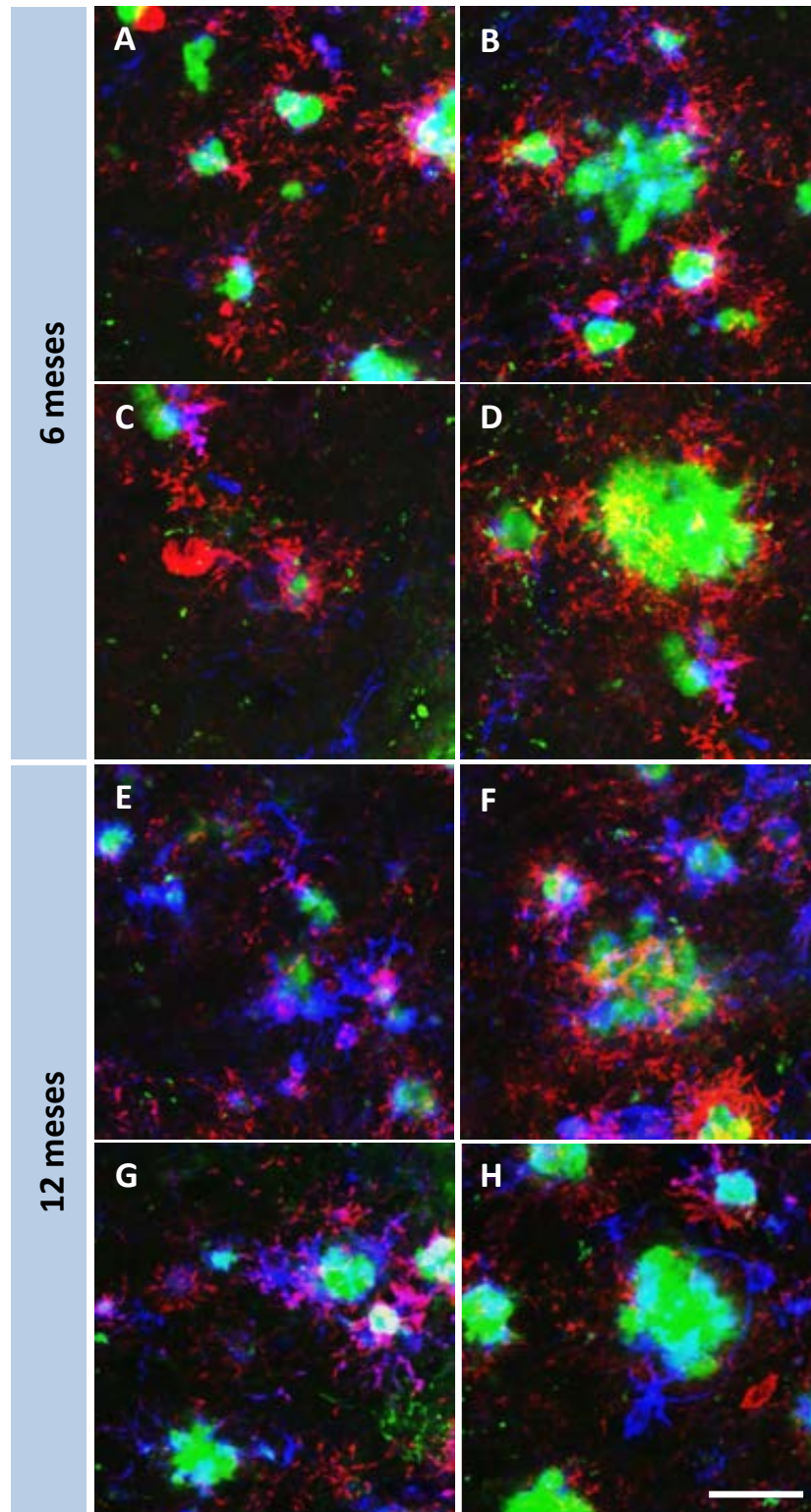


Figura 3.66. Aumento del recubrimiento microglial ferritina-positivo alrededor de las placas amiloides con la progresión de la patología. Imágenes representativas del marcaje fluorescente triple para placas amiloides (Tioflavina S, verde), microglía CD45-positiva (rojo) y células ferritina-positivas (azul) en la región CA1 de animales APP/PS1 de 6 (**A-D**) y 12 (**E-H**) meses. Proyecciones máximas a partir de imágenes en varios planos focales (*Z-stacks*) a microscopía láser confocal. Las placas de los animales de 12 meses presentan un mayor marcaje ferritina-positivo periplaca. Barra de escala: 25 μ m.

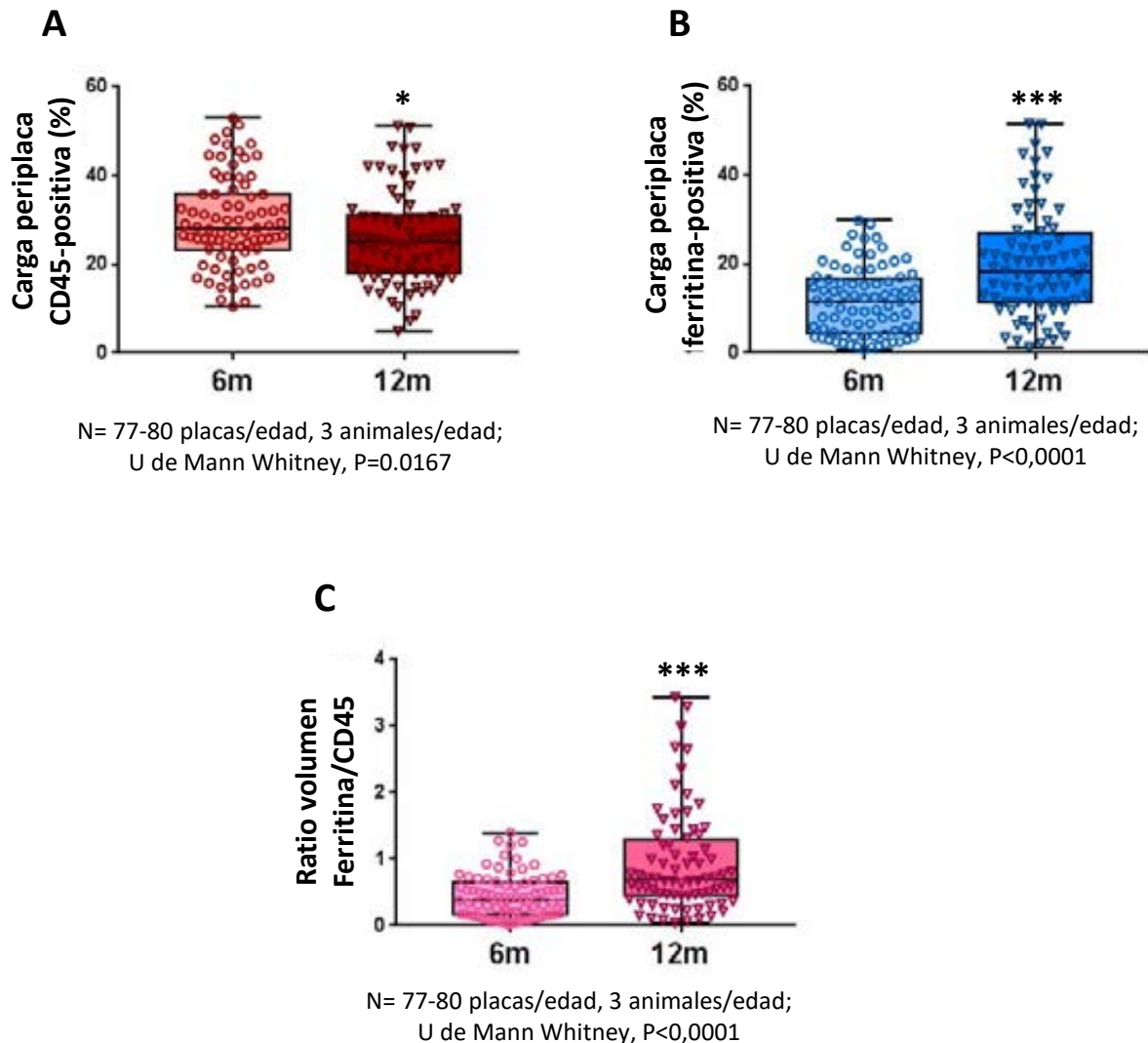


Figura 3.67. Cambios en el recubrimiento microglial de las placas amiloides de CA1 con la progresión de la patología. Cuantificación en volumen de la inmunorreactividad para CD45 (A) y ferritina (B) alrededor de placas en secciones de hipocampo con triple marcaje TioS/CD45/Ferritina en animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad. Se han utilizado imágenes *z-stack* tomadas a microscopía confocal. El recubrimiento microglial periplaca para CD45 disminuye de forma significativa entre los 6 y los 12 meses (A). En cambio, en estas mismas placas, el porcentaje de volumen periplaca ferritina-positivo aumenta significativamente con la edad (B). La cantidad de volumen ferritina-positivo con respecto al volumen CD45 alrededor de las placas (C) también aumenta entre los 6 y los 12 meses. Los datos representados en cajas corresponden a los percentiles 25, 50 y 75. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

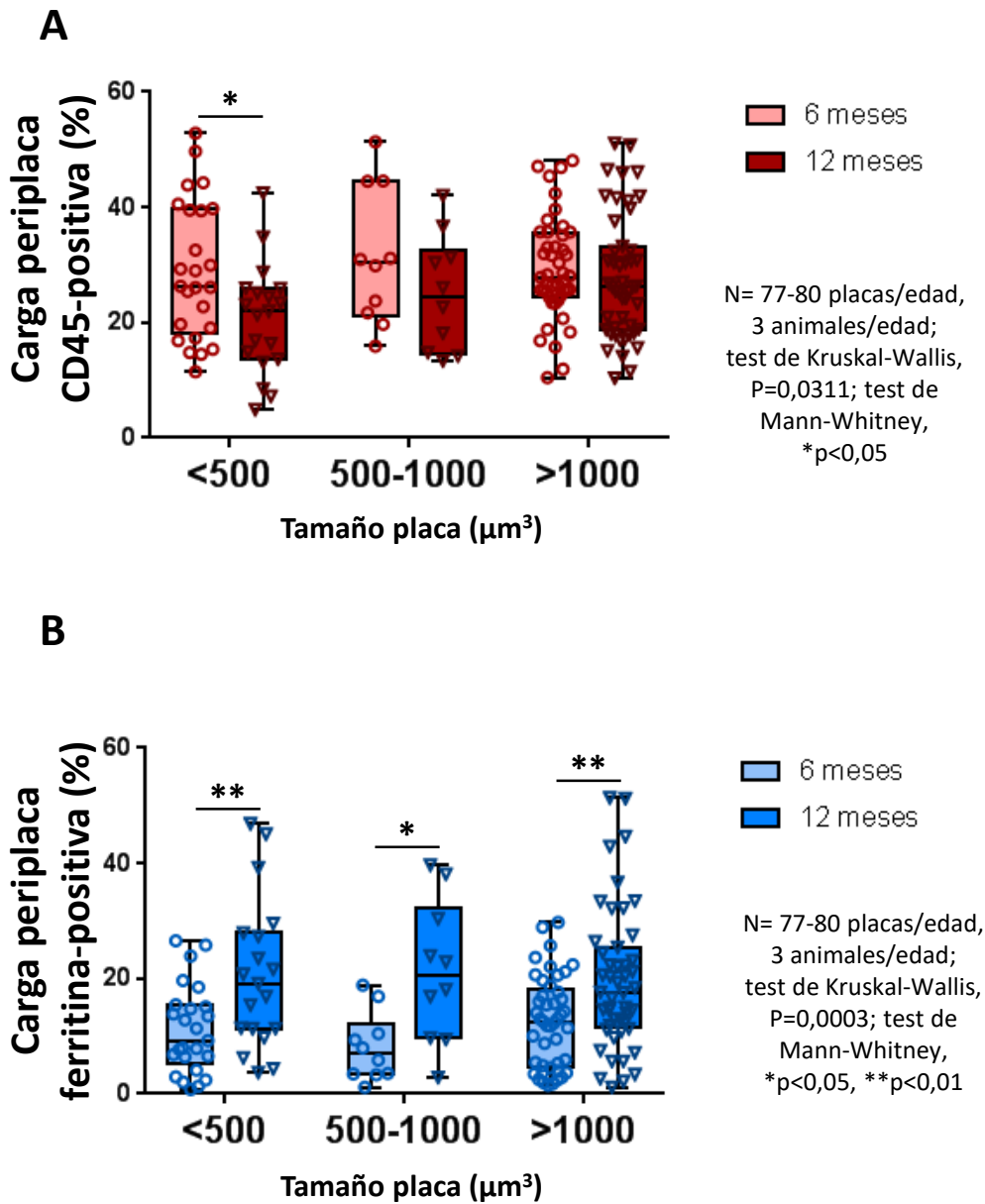


Figura 3.68. El recubrimiento microglial CD45-positivo disminuye con la edad mientras aumenta el recubrimiento ferritina-positivo. Estudio cuantitativo del recubrimiento microglial de las placas amiloides según su tamaño en la región CA1 del hipocampo de APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad. Las placas fueron divididas en tres rangos según el tamaño de su core TioS-positivo (<500 μm^3 , 500-1000 μm^3 y >1000 μm^3). **A**, el porcentaje de volumen periplaca CD45-positivo no varía significativamente en función del tamaño de las placas, aunque es menor en animales de 12 meses. **B**, el porcentaje de volumen periplaca ferritina-positivo es similar en los distintos rangos de tamaño de placas, siendo mayor en animales de 12 meses. Los datos representados en cajas corresponden a los percentiles 25, 50 y 75. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

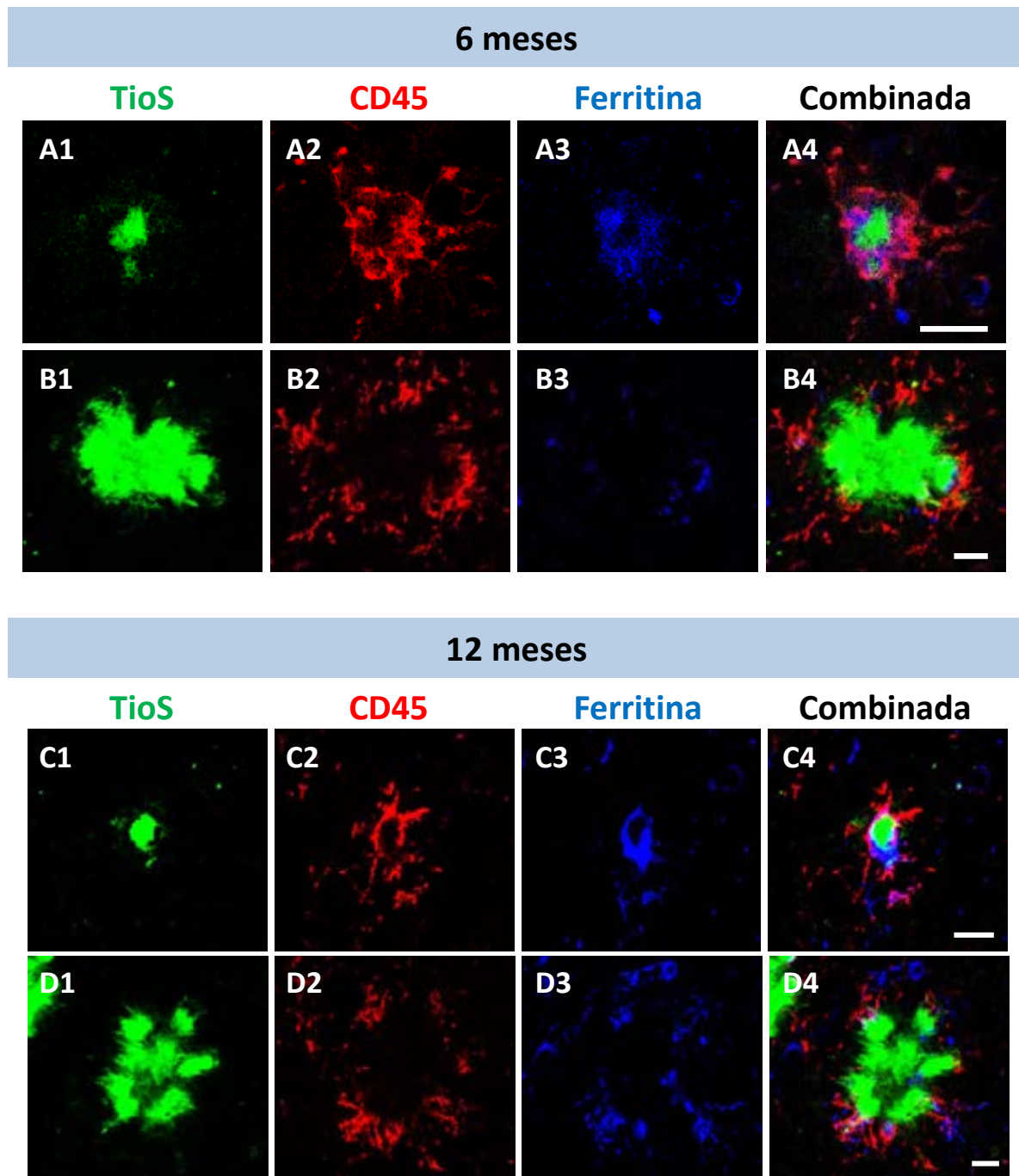
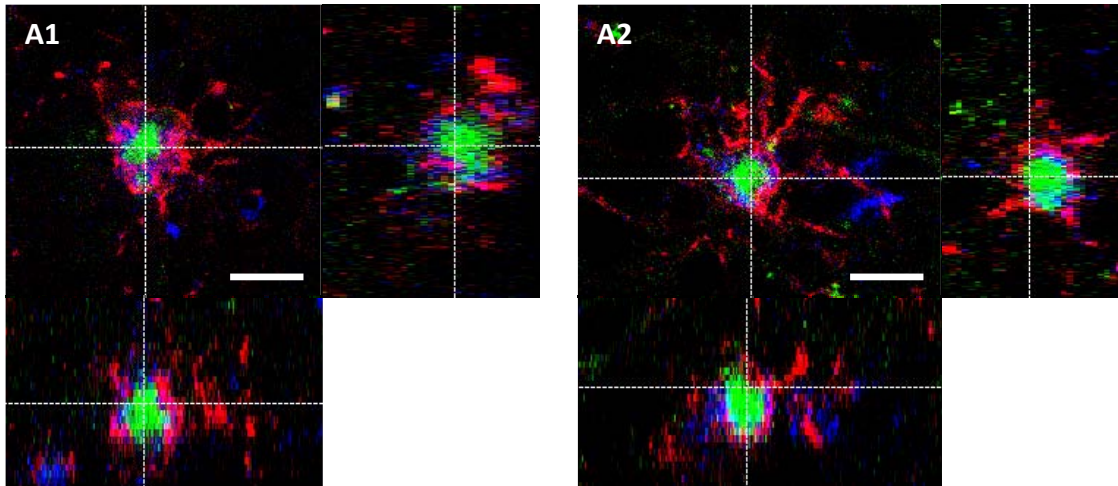


Figura 3.69. El recubrimiento microglial es comparativamente mayor en placas pequeñas que en grandes. Existen diferencias en el recubrimiento microglial entre las placas pequeñas y las de mayor tamaño en el hipocampo del modelo APP/PS1. Imágenes de microscopía láser confocal (un solo plano focal) de un marcaje triple de las placas amiloides (A1-D1; TioS, verde), las células microgliales CD45-positivas (A2-D2; rojo) y las células ferritina-positivas (A3-D3; azul). Tanto en animales de 6 meses (**A-B**) como en animales de 12 meses (**C-D**), se observa de forma cualitativa un mayor recubrimiento microglial en las placas pequeñas (A y C) en comparación con las placas grandes (B y D). Barras de escala: 10 μ m.

6 meses

TioS / CD45 / Ferritina



12 meses

TioS / CD45 / Ferritina

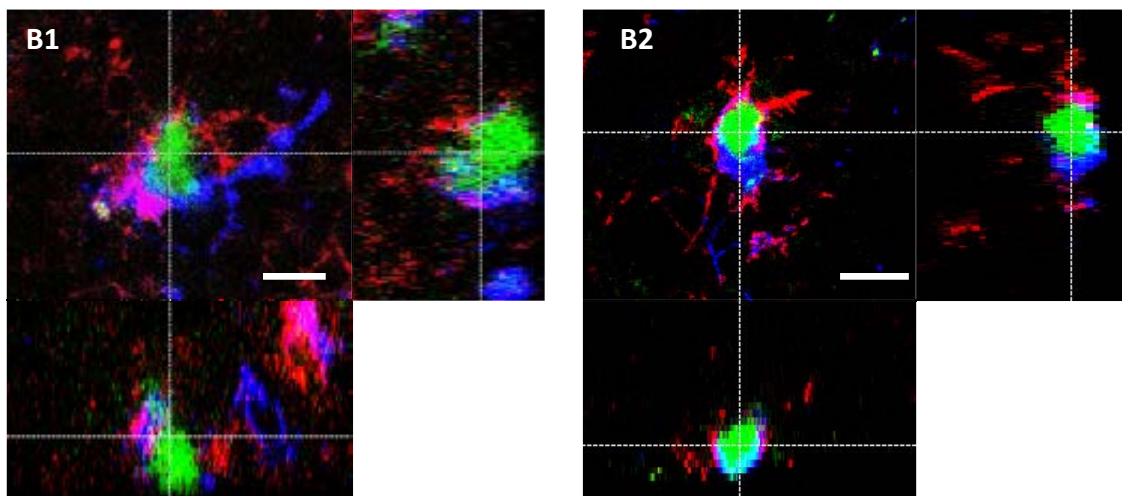


Figura 3.70. Las placas amiloides pequeñas están totalmente recubiertas por microglía. Vista ortogonal (YZ-XZ) de una serie de planos focales (Z-stacks) a microscopía láser confocal. Marcaje triple para placas amiloides fibrilares (TioS, verde), microglía activada CD45-positiva (rojo) y células ferritina-positivas (azul) en animales APP/PS1 de 6 (A) y 12 (B) meses de edad. Barras de escala: 10 μm.

que las placas de mayor tamaño tenían menor proporción de recubrimiento positivo para ferritina que las placas pequeñas ($P < 0,0001$) (**Fig. 3.71 B**). Al analizar la proporción de volumen ferritina-positivo con respecto al volumen CD45-positivo (ratio volumen ferritina/CD45) agrupando las placas por rangos de tamaño, no se observaron diferencias en función del tamaño de las placas, aunque sí se obtuvo que la cantidad relativa de ferritina era siempre mayor a los 12 meses que a los 6 meses ($P = 0,0001$) (**Fig. 3.71 C**). Por tanto, las placas grandes tienen en proporción un recubrimiento microglial menor que las placas pequeñas, pero todas ellas, tanto grandes como pequeñas, experimentan un incremento en la proporción del marcador ferritina respecto a CD45 con la edad. En general, se observó escasa colocalización entre los marcadores CD45 y ferritina. Además, se vio que no existía correlación, ni positiva ni negativa, entre la carga periplaca para estos dos marcadores, sugiriendo que se trata de poblaciones microgliales diferentes (correlación de Spearman 6 meses: $r = 0,0547$, $P = 0,6296$; 12 meses: $r = -0,0961$, $P = 0,4059$).

A continuación, se procedió a cuantificar la proporción de células microgliales alrededor de las placas amiloides que eran positivas para ferritina, así como comprobar si todas las células ferritina-positivas eran de naturaleza microglial. Para ello, se empleó inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para Iba1 (microglía) y para ferritina en animales de 6 (**Fig. 3.72**) y 12 (**Fig. 3.73 A-B**) meses de edad. En el hipocampo de animales APP/PS1, tanto a 6 como a 12 meses, se ha observado que una parte de la población microglial (Iba1-positiva) que rodea a las placas es también positiva para ferritina. Además, se observó un aumento cualitativo en la cantidad de microglía ferritina-positiva alrededor de las placas entre los 6 y los 12 meses. También, se detectaron algunas células ferritina-positivas que no eran de naturaleza microglial (Iba1-negativas), y que normalmente no estaban asociadas a placas. Para determinar la naturaleza de estas células no microgliales, se realizó una inmunofluorescencia doble para ferritina y olig2 (marcador de oligodendrocitos) para microscopía láser confocal (**Fig. 3.73 C**), detectándose algunos oligodendrocitos que expresaban ferritina, no obstante, se trataba de una proporción minoritaria. Además, se comprobó mediante inmunofluorescencia doble para GFAP y ferritina, que no se trataba de astrocitos, ya que no se observó colocalización entre GFAP y ferritina (resultados no mostrados). Empleando inmunofluorescencia doble para Iba1 y ferritina, se realizó un estudio cuantitativo de la población ferritina-positiva que rodea a las placas amiloides (**Fig. 3.74**). Para ello, se emplearon imágenes tomadas en *Z-stacks* mediante microscopía confocal en la región CA1 hipocampal de APP/PS1 a 6 y 12 meses. Se cuantificó el número de células Iba1+/ferritina+, Iba1+/ferritina- e Iba1-/ferritina+ alrededor de las placas amiloides. Al analizar las proporciones de cada subtipo celular (**Fig. 3.74 A**), se observó, tal y como se esperaba, que tanto a 6 como a 12 meses la mayoría de las células periplaca son microglía (Iba1-positivas) (6 meses: 96,40%; 12 meses: 98,19%), mientras que solo una parte minoritaria de las células periplaca ferritina-positivas son de naturaleza no microglial (Iba1-/ferritina+) (6 meses: 3,60%; 12 meses: 1,81%). Dentro de las células microgliales (Iba1-positivas), una gran parte expresaba ferritina (6 meses: 51,60%; 12 meses: 65,26%). Además, ocurre un aumento significativo en el número de células microgliales ferritina-positivas alrededor de las placas entre los 6 y los 12 meses ($p < 0,0001$) (**Fig. 3.74 B**).

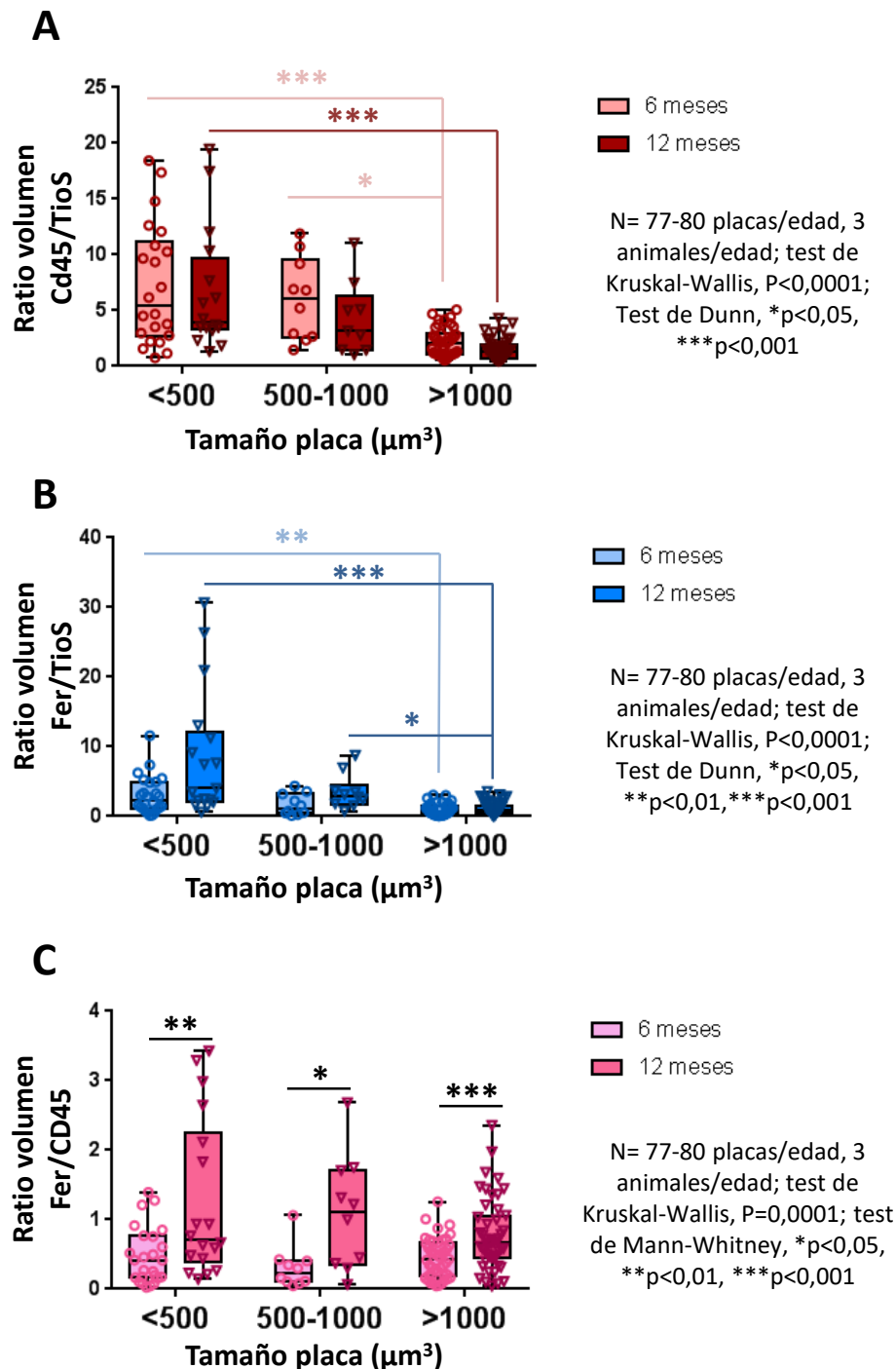


Figura 3.71. El recubrimiento microglial es mayor en placas pequeñas que en placas grandes. Estudio cuantitativo del recubrimiento microglial de las placas amiloides según su tamaño en la región de CA1 de animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad. Las placas fueron divididas en tres rangos según el tamaño de su core TioS-positivo (<500 μm^3 , 500-1000 μm^3 y >1000 μm^3). **A**, se analizó la cantidad relativa del volumen de recubrimiento microglial CD45-positivo con respecto al de Tioflavina-S (volumen/volumen), observándose que las placas de mayor tamaño tenían una menor proporción de envoltura CD45-positiva a ambas edades analizadas. **B**, el volumen ferritina-positivo con respecto al de Tioflavina-S (volumen/volumen) reveló que las placas de mayor tamaño también tenían una menor proporción de envoltura ferritina-positiva que las pequeñas. **C**, la cantidad de volumen ferritina-positivo con respecto a CD45 alrededor de las placas es mayor en las placas de todos los tamaños a 12 meses de edad. Los datos representados en cajas corresponden a los percentiles 25, 50 y 75. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

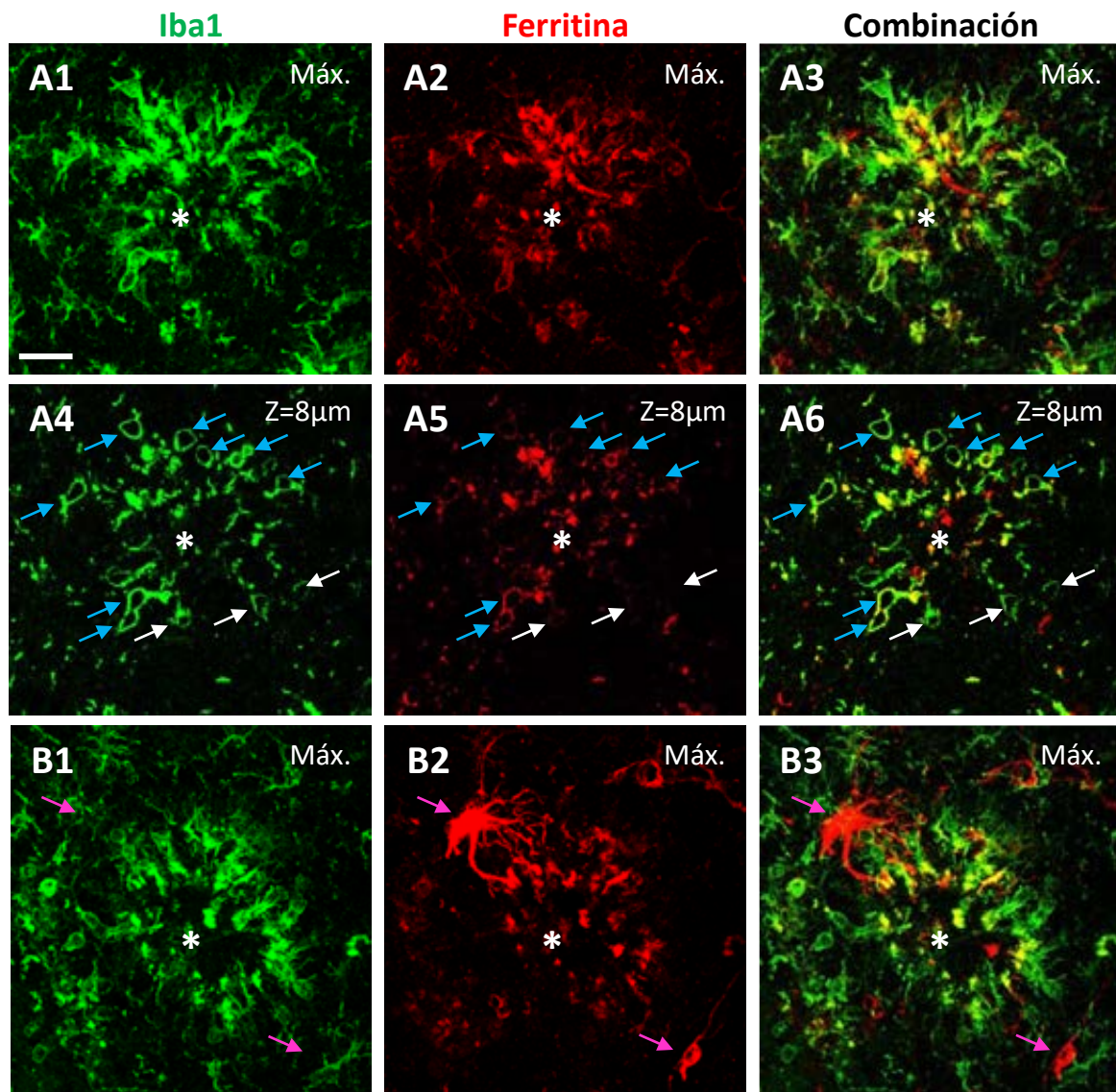


Figura 3.72. La mayoría de células ferritina-positivas que rodean las placas son células microgliales en el hipocampo de APP/PS1 de 6 meses de edad. Inmunofluorescencia doble a microscopía confocal para los marcadores Iba1 (microglía, verde) y ferritina (rojo), las placas amiloides se indican con asterisco. Se muestran imágenes de dos placas amiloides de CA1 en **A** (**A1-3** proyecciones máximas, **A4-6** imágenes de un solo plano focal) y **B** (**B1-3** proyecciones máximas). La mayoría de células periplaca son de naturaleza microglial (Iba1+/ferritina+: flechas azules, Iba1+/ferritina-: flechas blancas). Se observan escasas células Iba1-/ferritina+ (flechas rosas en B), la mayoría no asociadas a placas. Barra de escala: 20 μ m.

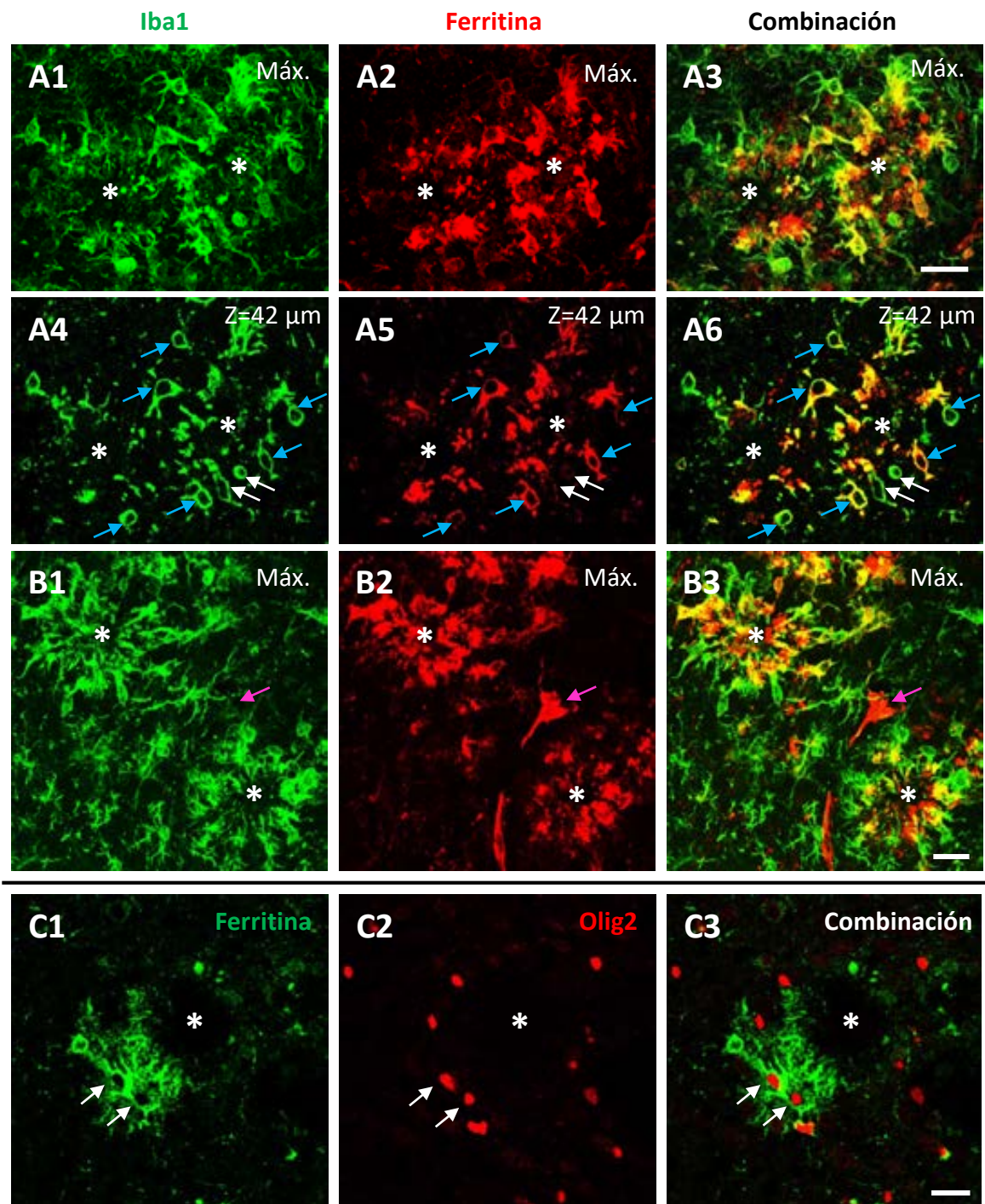
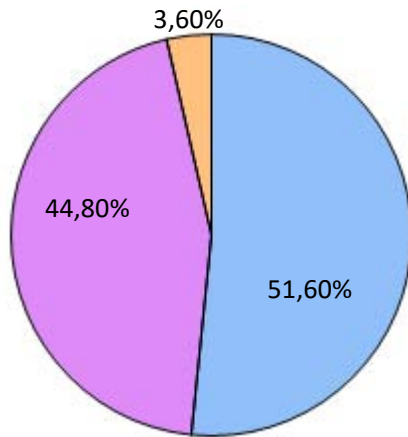
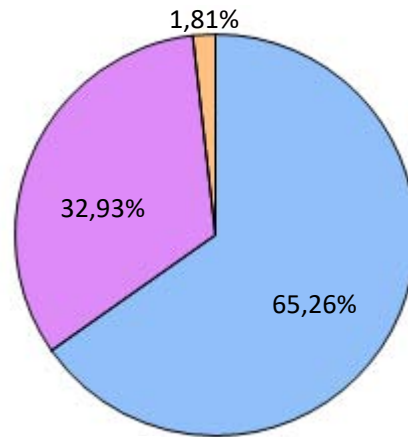


Figura 3.73. La cantidad de células ferritina-positivas periplaca aumenta con la patología amiloide. **A** y **B**, inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para el marcador microglial Iba1 (verde) y para ferritina (rojo) alrededor de las placas amiloides (indicadas con asterisco) en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad. **A1-3** y **B1-3** son imágenes de proyecciones máximas, **A4-6** imágenes de un solo plano focal. La mayoría de células ferritina-positivas periplaca son de naturaleza microglial (Iba1+/ferritina+: flechas azules, Iba1+/ferritina-: flechas blancas). Se observaron escasas células Iba1-/ferritina+ (flecha rosa en B), mayoritariamente no asociadas a placas. **C**, mediante inmunofluorescencia doble para ferritina (verde) y Olig2 (marcador de oligodendrocitos, rojo) se observaron algunos oligodendrocitos ferritina-positivos (flechas blancas en C). Barras de escala: 20 μm.

A1 6 meses**A2 12 meses**

Iba1+/Ferritina+
 Iba1+/Ferritina-
 Iba1-/Ferritina+

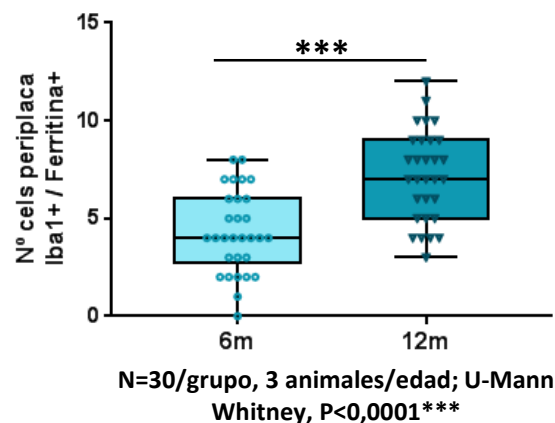
B

Figura 3.74. El porcentaje de células microgliales periplaca que expresan ferritina aumenta significativamente con la patología. Estudio cuantitativo de la población microglial ferritina-positiva que rodea las placas amiloides en el hipocampo de animales APP/PS1 a 6 y 12 meses de edad. En imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia doble para Iba1 y ferritina se cuantificó el número de células Iba1+/ferritina+, Iba1+/ferritina- e Iba1-/ferritina+ alrededor de las placas amiloides. **A**, proporciones de células de cada subtipo alrededor de las placas a 6 (A1) y 12 (A2) meses. A ambas edades, la mayoría de las células ferritina-positivas son Iba1+, mientras que las células ferritina-positivas no microgliales (Iba1-) son minoritarias. Dentro de las células microgliales (Iba1+), una gran parte expresaba ferritina. **B**, entre los 6 y los 12 meses, ocurre un aumento en el número de células microgliales que expresan ferritina alrededor de las placas. Los datos representados en cajas corresponden a los percentiles 25, 50 y 75, la estadística y significancia se indican la gráfica.

A continuación, se analizó a nivel ultraestructural si la microglía ferritina-positiva en el hipocampo del modelo APP/PS1 era la microglía oscura. Sin embargo, mediante microscopía electrónica de transmisión empleando inmuno-oro para ferritina (Fig. 3.75) pudimos observar que la microglía que expresa ferritina también presenta diversos subtipos ultraestructurales según el grado de electrodensidad de su citoplasma. La localización de la marca se daba principalmente en el citoplasma microglial. Se observó microglía ferritina-positiva poco electrodensa, con electrodensidad intermedia y muy electrodensa (oscura), todas ellas cerca de placas amiloides. Aunque la mayoría de las células microgliales cercanas a placas presentaban marca ferritina-positiva, se observaron distintos grados de inmunorreactividad. En el caso de la microglía oscura, la elevada electrodensidad de la célula dificultaba incluso en ocasiones la identificación del inmunomarcaje.

Estos resultados en conjunto sugieren que con la edad ocurren cambios en la envoltura microglial de las placas en el modelo APP/PS1. Con la progresión de la enfermedad, las placas están menos recubiertas por microglía activada CD45-positiva mientras que aumenta el recubrimiento por parte de la microglía degenerativa ferritina-positiva. Además, las placas de gran tamaño tienen proporcionalmente un recubrimiento microglial menor que las placas pequeñas. Esto daría lugar a que las placas de gran tamaño, menos aisladas, sean por tanto más tóxicas y generen una mayor cantidad de distrofias.

3.2.8. LA MICROGLÍA PERIPLACA PRESENTA SIGNOS DE DEGENERACIÓN

Habiendo detectado previamente un aumento en la expresión de ferritina alrededor de las placas amiloides y pudiendo esto estar relacionado con un fenotipo patológico de la microglía, nuestro siguiente objetivo fue identificar posibles signos de degeneración microglial. En inmunofluorescencia doble para microscopía confocal con BAM10 (A β) e Iba1 (microglía) (Fig. 3.76), se detectaron alteraciones morfológicas en la microglía que rodea a las placas amiloides. Concretamente, en la zona de contacto entre la microglía y el core de las placas amiloides se observó una gran acumulación de marca Iba1-positiva, que podría corresponderse con engrosamientos en las prolongaciones microgliales.

Empleando microscopía electrónica de transmisión, se detectaron engrosamientos anormales en las prolongaciones microgliales alrededor de las placas amiloides y que denominamos como distrofias microgliales (Figs. 3.77-3.78). Estas distrofias presentaban en su interior vesículas de tamaño variable y de contenido electrodensito heterogéneo asociadas con procesos de autofagia en algunos casos. Mediante inmuno-oro para CD45, se confirmó que estos engrosamientos distróficos pertenecían a células microgliales activadas, ya que estaban rodeados por una membrana positiva para CD45. En las prolongaciones microgliales, marcadas con CD45 (Fig. 3.79 A-B) y con Iba1 (Fig. 3.79 C), se observó en el citoplasma la presencia de gran cantidad de vesículas de diverso tamaño. Estas prolongaciones microgliales se hallan íntimo contacto con las fibras amiloides y la gran cantidad de vesículas que contienen podría suponer el paso previo a la formación de distrofias microgliales alrededor de las placas.

En la microglía que rodea a las placas amiloides también se observaron otros rasgos indicadores de patología, como la presencia de alteraciones en la morfología de las mitocondrias (Figs. 3.80-3.82). A microscopía electrónica de transmisión se observó que las

mitocondrias microgliales presentaban diversas alteraciones estructurales como crestas dilatadas e irregulares, huecos con ausencia de crestas, morfología aberrante (arriñonada, muy alargada, zonas con estrangulaciones) y, en ocasiones, se acompañaba de signos de autofagia. Estas alteraciones no se detectaron en la microglía interplaca, ni en células circundantes del parénquima cerebral.

En resumen, en nuestro modelo APP/PS1, ocurre una clara asociación entre las placas amiloides y la activación de la microglía, sobreexpresando una serie de genes relacionados con el perfil de activación DAM (*CD68*, *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP*, *APOE*, etc.). Hemos obtenido evidencias a nivel celular y subcelular que sugieren que la microglía activada alrededor de las placas podría realizar funciones beneficiosas como fagocitosis/degradación de A β , fibrilación/compactación de placas amiloides (secuestrando las formas oligoméricas más tóxicas) y formación de una envoltura/aislamiento de estos depósitos (contención de su toxicidad). Sin embargo, con el avance de la patología amiloide, la reactividad microglial se frena y la microglía periplaca adquiere un fenotipo disfuncional patológico disminuyendo su capacidad de barrera entre las placas y el parénquima nervioso.

Ferritina

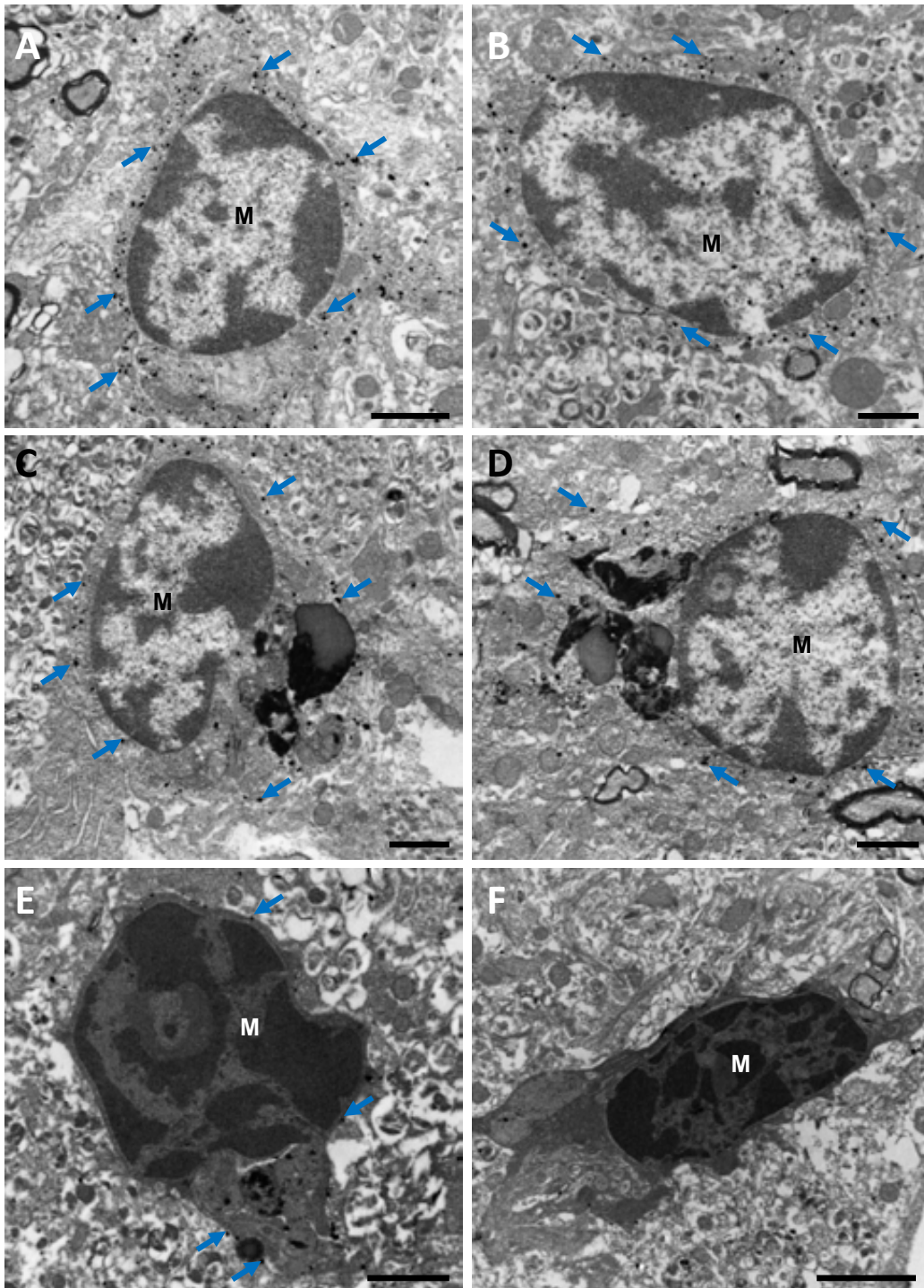


Figura 3.75. Subtipos ultraestructurales de microglía asociada a placa que expresa ferritina. Inmuno-oro para ferritina a microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de APP/PS1. Las células microgliales (M) cercanas a placas amiloides presentan distintos grados de inmunorreactividad para el marcador ferritina. La marca inmunopositiva (flechas azules) se encuentra principalmente en el citoplasma de las células. **A-B**, microglía poco electrodensa; **C-D**, microglía con electrodensidad intermedia; **E-F**, microglía electrodensa (microglía oscura). En la microglía electrodensa es más difícil detectar la marca ferritina-positiva. Barras de escala: 1 µm.

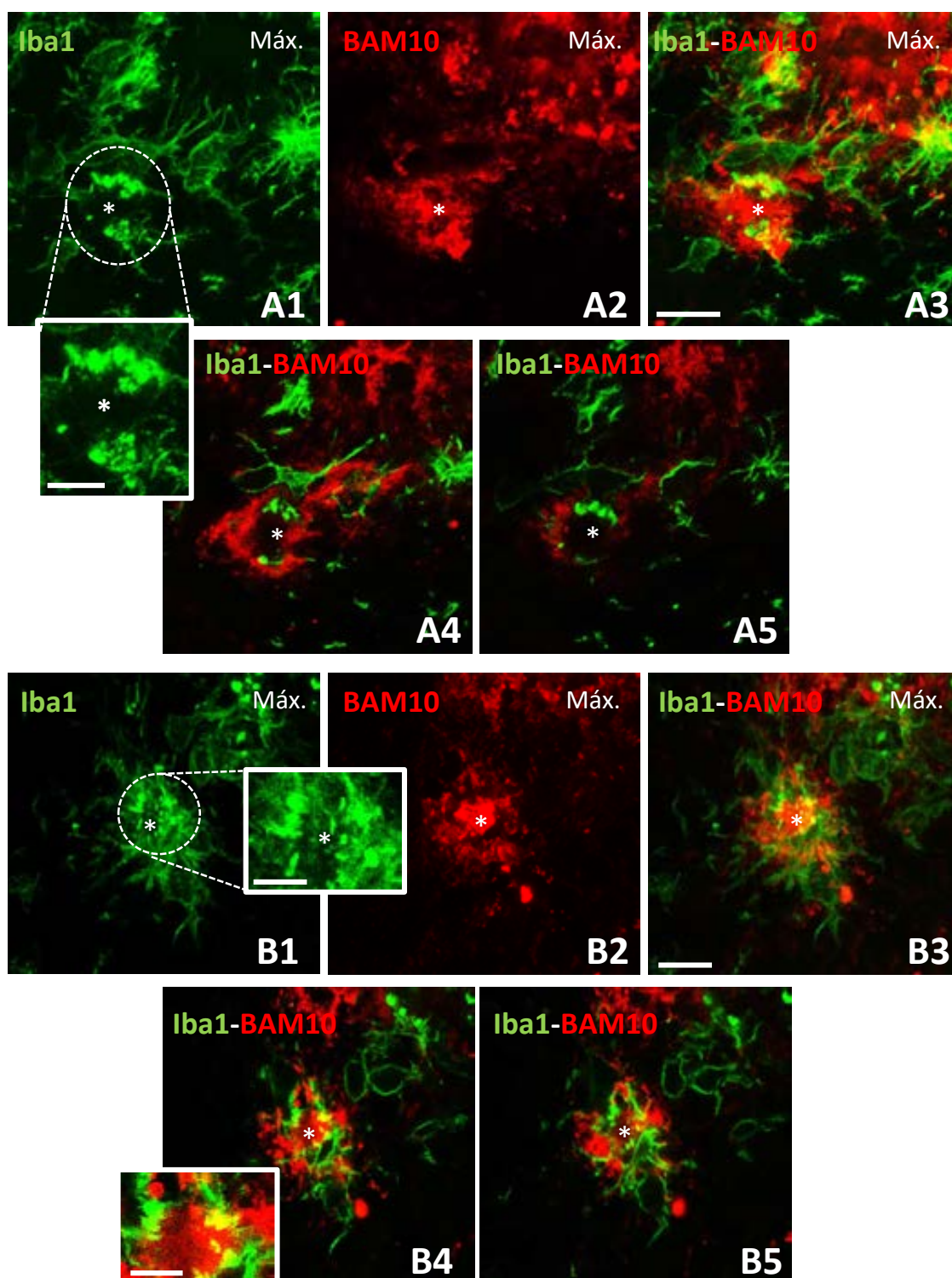


Figura 3.76. La microglía que rodea el core de las placas presenta engrosamientos en sus prolongaciones. Inmunofluorescencia doble a microscopía confocal para Iba1 (microglía, verde) y BAM10 (A β , rojo). En **A1-A3** y **B1-B3** se muestran las proyecciones máximas de dos placas amiloides (core indicado con asterisco) rodeadas por microglía. En A1 y B1 hay detalles insertos de la zona de contacto microglía-placa, con elevada acumulación de Iba1. En **A4-A5** y **B4-B5** se muestran planos focales de esas mismas placas. Barras de escala: 10 μ m (A y B) y 5 μ m (Insertos en A1, B1 y B4).

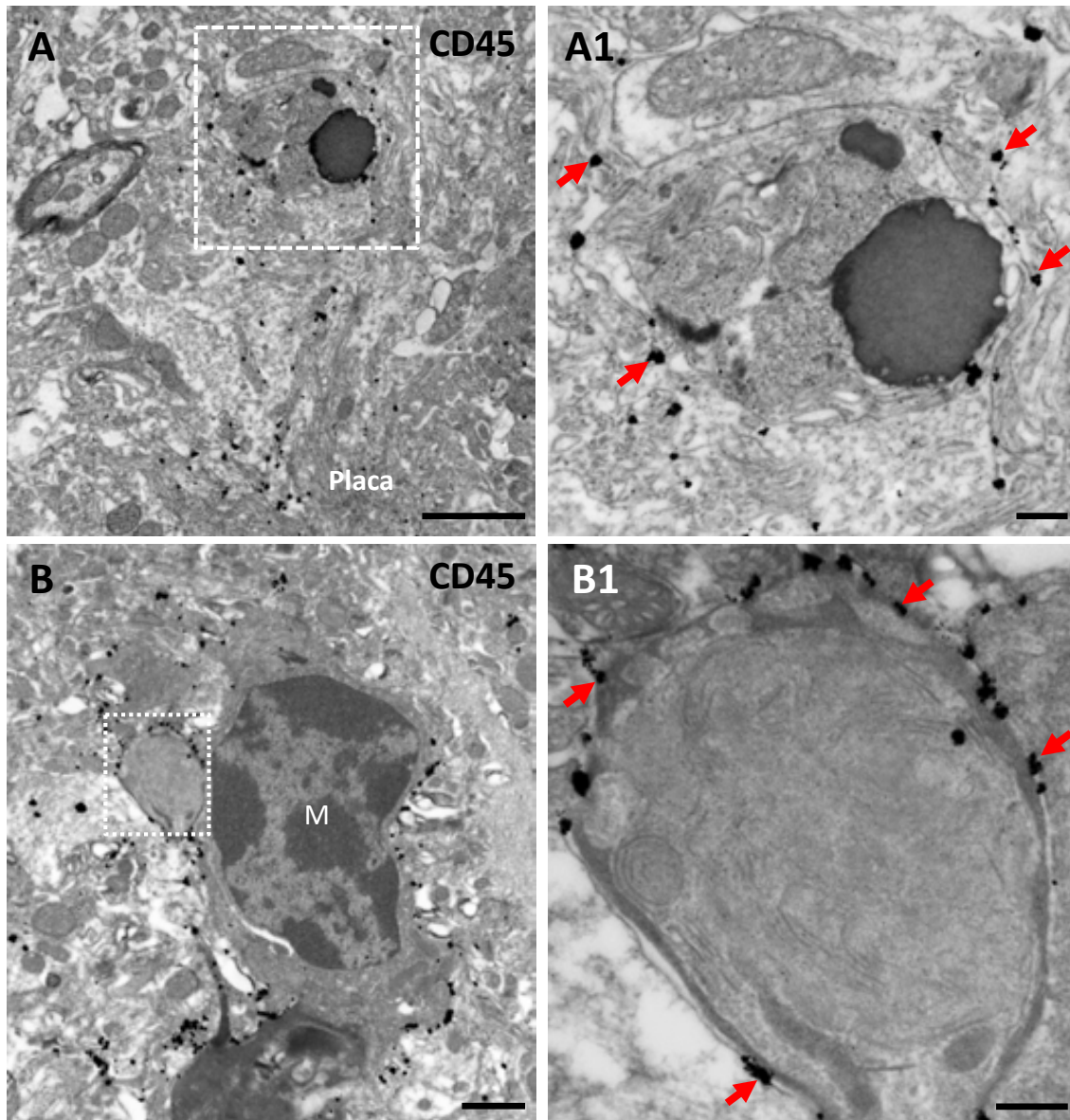


Figura 3.77. Ultraestructura de prolongaciones distróficas microgliales. A y B, inmuno-oro para CD45 a microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de APP/PS1. A1 y B1, detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas en A y B, respectivamente. Se observan engrosamientos de naturaleza microglial (positivos para CD45, flechas rojas) que contienen vesículas de distinta naturaleza en su interior. M: microglía. Barras de escala: 1 μ m (A y B) y 0,2 μ m (A1 y B1).

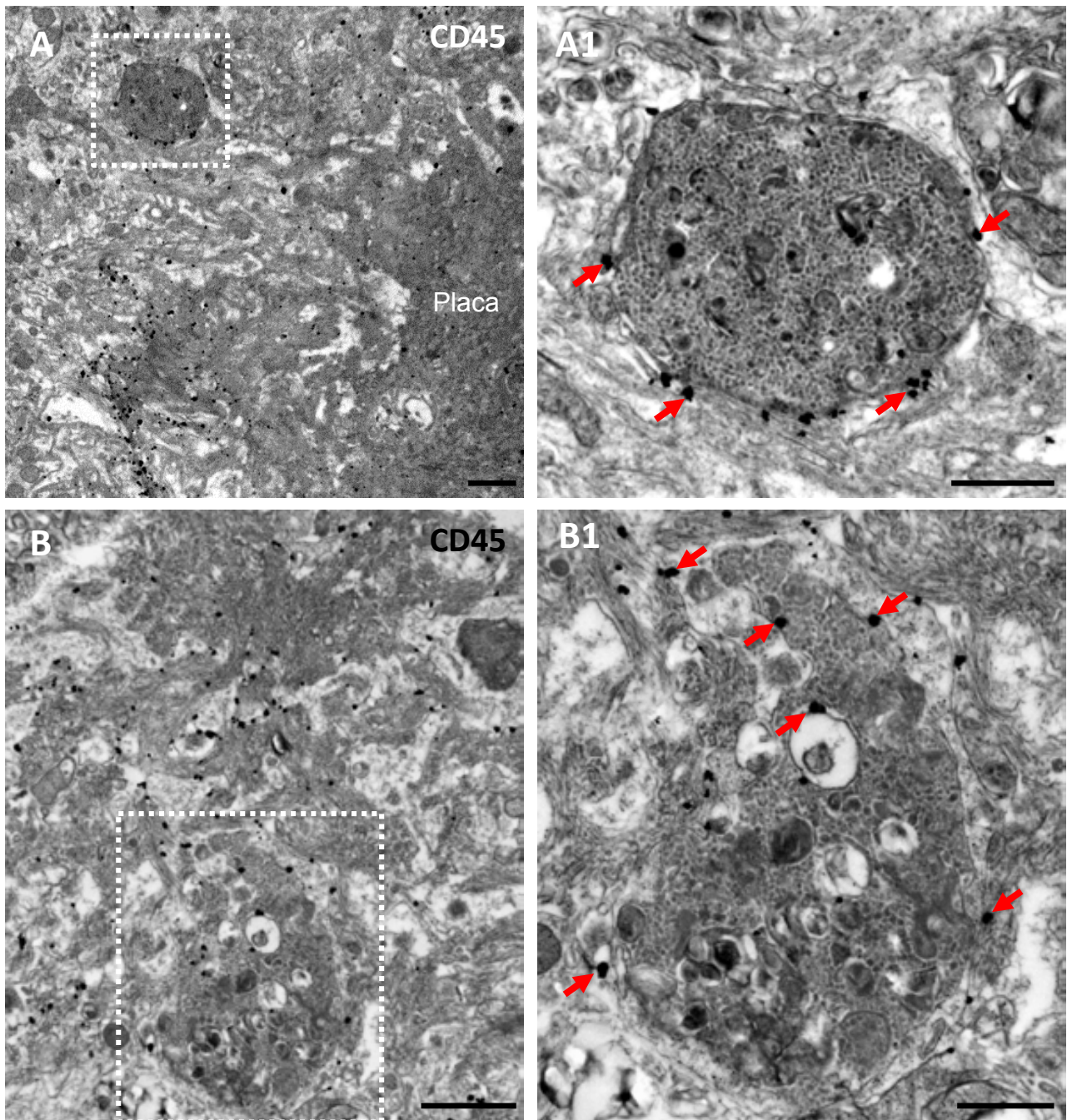


Figura 3.78. Caracterización ultraestructural de distrofias microgliales periplaca en el hipocampo de APP/PS1 (I). A y B, inmuno-oro para CD45 a microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de APP/PS1. A1 y B1, detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas en A y B, respectivamente. Los engrosamientos de las prolongaciones microgliales (positivos para CD45, flechas rojas) presentan un contenido vesicular muy heterogéneo. Es característico el aspecto granulado del citoplasma. Barras de escala: 1 μ m (A y B) y 0,5 μ m (A1 y B1).

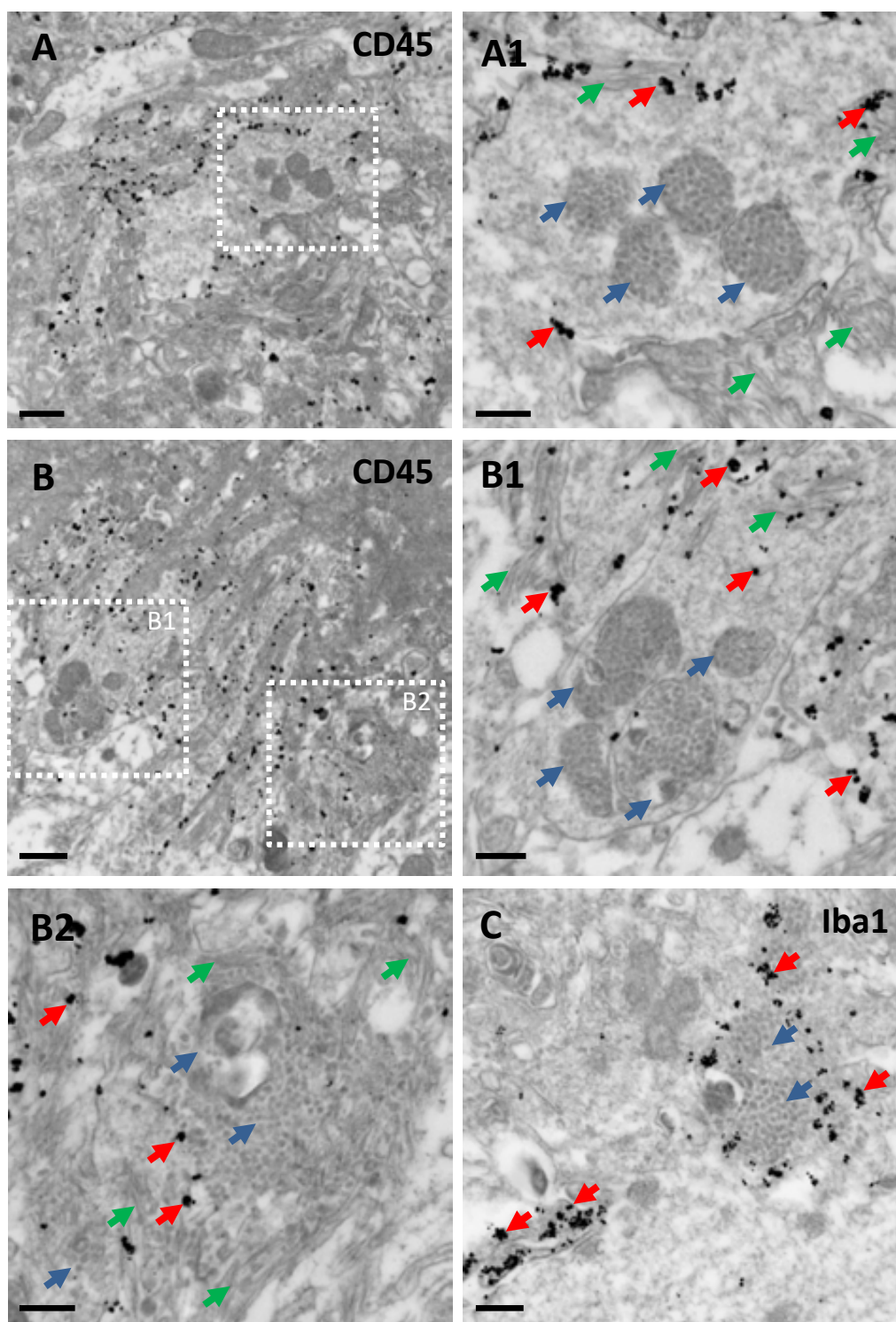


Figura 3.79. Caracterización ultraestructural de distrofias microgliales periplaca en el hipocampo de APP/PS1 (II). Microscopía electrónica de transmisión. A y B, inmuno-oro para CD45 en hipocampo de APP/PS1. A1, B1 y B2, detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas en A y B. C, inmuno-oro para Iba1. Las prolongaciones microgliales (positivas para CD45 e Iba1, flechas rojas) cercanas a las fibras amiloides (flechas verdes) contienen multitud de vesículas (flechas azules) con contenido heterogéneo. Barras de escala: 0,5 μm (A y B) y 0,2 μm (A1, B1-B2 y C).

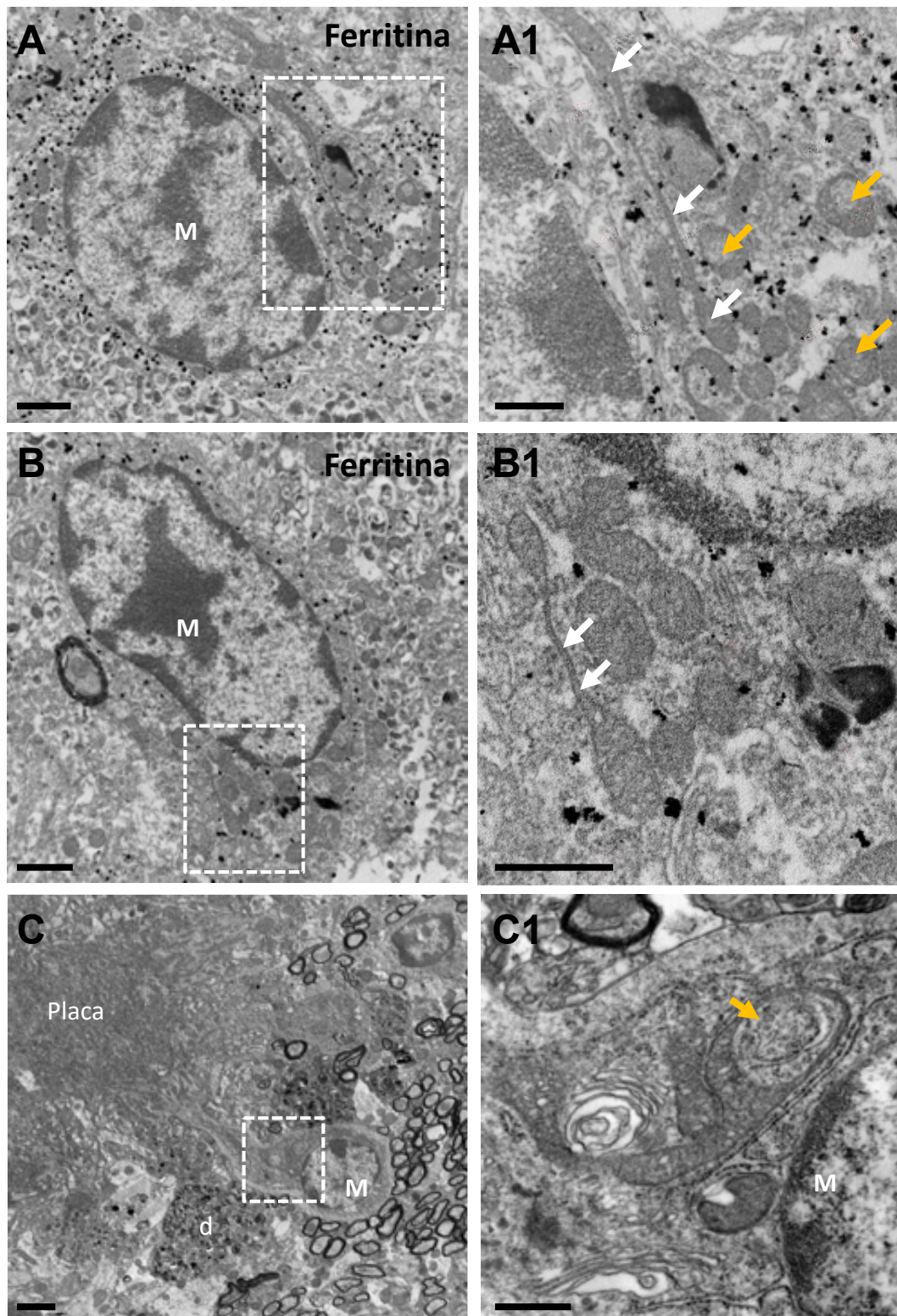


Figura 3.80. La microglía periplaca presenta mitocondrias con alteraciones morfológicas (I). A-B, inmuno-oro para ferritina a microscopía electrónica de transmisión en hipocampo de APP/PS1. **A1** y **B1**, detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas en A y B, respectivamente. **C**, microscopía electrónica de transmisión convencional en hipocampo de APP/PS1. **C1**, detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en C. Las mitocondrias de la microglía periplaca presentan una morfología anómala, con crestas dilatadas, forma arriñonada, regiones con estrangulaciones (flechas blancas) y signos de autofagia (flechas amarillas). M: microglía, d: distrofias neuríticas. Barras de escala: 2 μm (C), 1 μm (A y B) y 0,5 μm (A1, B1, C1).

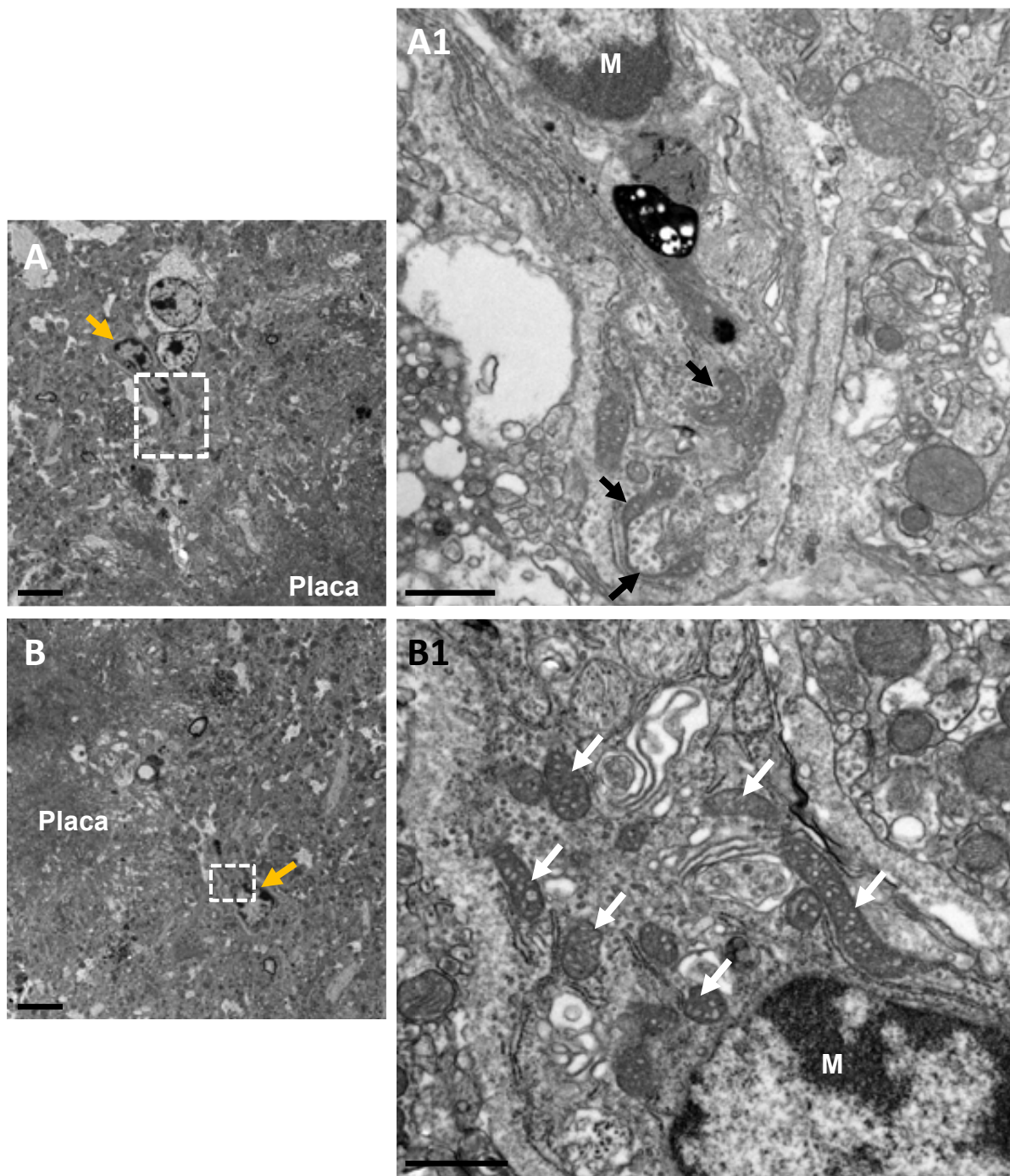


Figura 3.81. La microglía periplaca presenta mitocondrias con alteraciones morfológicas (II). A-B, microscopía electrónica de transmisión convencional en hipocampo de APP/PS1. A1 y B1, detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas en A y B, respectivamente. La microglía periplaca presenta mitocondrias con aspecto anómalo, crestas dilatadas (flechas blancas), forma arriñonada (flechas negras), regiones con estrangulaciones y signos de autofagia. M: microglía, flechas amarillas: cuerpos celulares microgliales. Barras de escala: 5 μ m (A y B) y 1 μ m (A1 y B1).

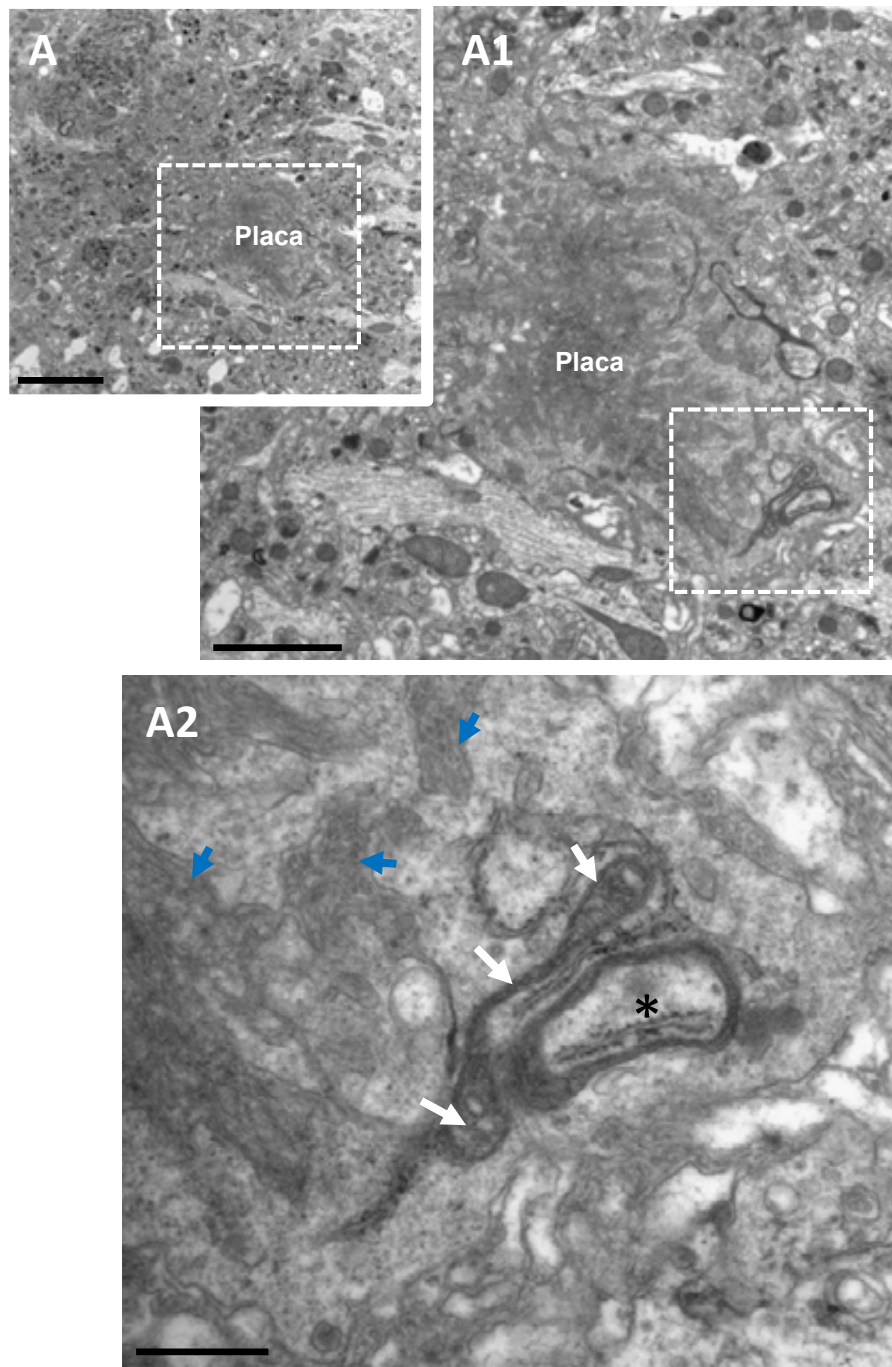


Figura 3.82. La microglía periplaca presenta mitocondrias con alteraciones morfológicas (III). A, imagen panorámica a microscopía electrónica de transmisión convencional de una placa rodeada por citoplasma microglial en el hipocampo de APP/PS1. A1, detalle de la zona recuadrada en A. A2, aumento de la zona recuadrada en A1. La microglía que rodea a las placas presenta mitocondrias con morfología aberrante, crestas dilatadas, forma arriñonada, regiones con estrangulaciones (flechas blancas) y signos de autofagia (asterisco). Flechas azules: fibras amiloides. Barras de escala: 5 μm (A), 2 μm (A1) y 0,5 μm (A2).

3.3. ESTUDIO *IN VIVO* DE LA PROPAGACIÓN DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE

Tradicionalmente se ha considerado que las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares eran los principales responsables de la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, en los últimos años se ha determinado que las formas oligoméricas tanto de A β como de fosfo-Tau tienen una toxicidad mucho más alta que los depósitos insolubles (Viola and Klein 2015; D'Orange et al. 2018). De hecho, aunque no existe correlación entre el deterioro cognitivo y la carga amiloide, sí se ha observado una alta correlación entre la pérdida neuronal y los niveles de oligómeros solubles de A β (DaRocha-Souto et al. 2011). Además de sus efectos tóxicos, estos oligómeros estarían implicados en la propagación de la patología amiloide, ya que actuarían como semillas que favorecen el plegamiento alternativo y la agregación de los monómeros de A β (Viola and Klein 2015; Olsson et al. 2018; Parhizkar et al. 2019).

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar la capacidad de los oligómeros solubles de acelerar la agregación y progresión de la patología amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Para ello, se han realizado inyecciones estereotáxicas intracerebrales en distintos modelos animales (dos de las formas familiares y uno de la forma esporádica de la enfermedad) empleando las fracciones solubles cerebrales obtenidas a partir de muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) y de modelos amiloidogénicos APP/PS1 de 18 meses de edad. El efecto de estas inyecciones sobre la patología amiloide se comprobó empleando principalmente técnicas inmunohistoquímicas, técnicas estereológicas y análisis de imagen para detectar cambios en la carga amiloide y la carga microglial.

3.3.1. LAS FRACCIONES SOLUBLES DERIVADAS DE PACIENTES DE ALZHEIMER Y DE RATONES APP/PS1 ACELERAN LA PATOLOGÍA AMILOIDE Y LA RESPUESTA MICROGLIAL *IN VIVO* EN UN MODELO APP

En primer lugar, se han caracterizado los niveles de A β oligomérico en las fracciones solubles (S1) derivadas del hipocampo *post mortem* de pacientes de Alzheimer (clasificados según patología Tau como Braak V-VI) y de ratones APP/PS1 de 18 meses de edad. Mediante inmunohistoquímica para A β oligomérico prefibrilar (anticuerpo OC) en secciones de hipocampo, se evidencia que la patología amiloide es mucho más agresiva en el modelo animal, que sobreexpresa el gen APP humano mutado, que en pacientes de Alzheimer (Fig. 3.83). Las muestras humanas de tejido proceden de la misma cohorte de individuos de los que se han obtenido las fracciones solubles. Las placas amiloides se localizan preferentemente en la región de CA1, la capa molecular del giro dentado y la región hilar de los individuos Braak V-VI, sin embargo, no suelen apreciarse placas en los individuos Braak II (Fig. 3.83 A1 y A2). Por otro lado, la patología Tau en los pacientes de Alzheimer es muy destacada desde estadios iniciales de la enfermedad, con acumulación de fosfo-Tau (inmunohistoquímica con el anticuerpo AT8) muy marcada ya en la región CA1 del hipocampo de los individuos Braak II, y que alcanza niveles máximos en la etapa Braak V-VI, tanto en CA1 como en giro dentado (Fig. 3.83 A3 y A4). En los animales APP/PS1, la acumulación de placas amiloides comienza a edades muy tempranas, empezando por la región del subículo (3 meses de edad; no mostrado) y

extendiéndose al resto de regiones ya a los 6 meses; el número y tamaño de las placas aumenta progresivamente con la edad (Fig. 3.83 B1-B3).

Además, las fracciones solubles S1 fueron analizadas mediante dot blots utilizando el anticuerpo OC (experimento realizado en colaboración con el Dr. Javier Vitorica) (Fig. 3.84). Se detectaron oligómeros prefibrilares de A β tanto en las muestras de pacientes de Alzheimer como en los ratones APP/PS1, siendo significativamente mayor la cantidad de estos oligómeros conforme progresaba la patología desde Braak II a Braak V-VI en pacientes ($F(2,35)=17,22$, $P<0,0001$) y de los 6 a los 18 meses de edad en el modelo APP/PS1 ($F(2,9)=17,98$, $P=0,0007$). Las fracciones solubles de los pacientes (Braak V-VI), además de presentar oligómeros solubles de A β , también contienen otras proteínas, entre ellas Tau fosforilado (fosfo-Tau) soluble (no mostrado).

Para comprobar la capacidad de agregación de las fracciones solubles del hipocampo de pacientes (Braak V-VI), se realizó un ensayo *in vitro* (Fig. 3.85), comparándolas con las fracciones de individuos control (patología Tau Braak II y sin deterioro cognitivo) y también con tampón sin muestras de pacientes (buffer). Este estudio fue realizado en el laboratorio dirigido por el Dr. Rodrigo Morales de la Universidad de Texas (Houston, USA). Brevemente, se incubaron las fracciones solubles de pacientes Braak II, Braak V-VI y buffer (dilución 10^{-5}) en presencia de A β_{40} monomérico ($2\mu\text{M}$) y Tioflavina-T. Si las muestras de las fracciones solubles contienen A β con capacidad de nucleación, inducirán la agregación del A β monomérico que comenzará a formar fibras que serán detectadas por la unión a la Tioflavina-T. La detección de la fluorescencia emitida por la Tioflavina-T, que se une específicamente a las fibras amiloides, indica la presencia de agregados fibrilares. Por tanto, cuanto mayor es la cantidad de fluorescencia emitida, mayor es la agregación de A β que se produce en las muestras. Se midió la emisión de fluorescencia a distintos tiempos durante 100h, con lo que se obtuvieron las curvas de agregación de las distintas muestras (Fig. 3.85 A). Las muestras de pacientes inducían la agregación de forma más temprana que el control (buffer). Concretamente, las muestras de individuos Braak II comenzaban a agregar antes que las muestras Braak V-VI, sin embargo, estas últimas agregaban de forma más rápida (curva de agregación con mayor pendiente). Al comparar la emisión de fluorescencia a las 70h (Fig. 3.85 B), se observó que la cantidad de agregados Tioflavina-T positivos era significativamente mayor en las muestras Braak V-VI en comparación con el control (buffer) ($p<0,01$), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las muestras Braak II y Braak V-VI, ni entre las muestras Braak II y el control.

A continuación, se realizó el estudio de la capacidad de propagación y agregación *in vivo* de las fracciones solubles S1 aisladas del hipocampo de pacientes Braak V-VI y de ratones APP/PS1 de 18 meses. Estas fracciones fueron inyectadas intracerebralmente en el hipocampo derecho de ratones silvestres (WT) y ratones transgénicos APP de 4 meses de edad, empleando PBS como control negativo ($n=11-16$ animales/grupo). Transcurridos 3 meses post-inyección, cuando los animales tenían 7 meses de edad, fueron sometidos a una serie de pruebas conductuales/cognitivas (campo abierto, prueba de anidamiento, reconocimiento de lugar de objeto, reconocimiento de nuevo objeto, laberinto en Y, laberinto en Y de contexto) para determinar el impacto a nivel funcional de la inoculación de estas fracciones solubles. En las pruebas cognitivas, se emplearon también animales no operados de la misma edad. Estas

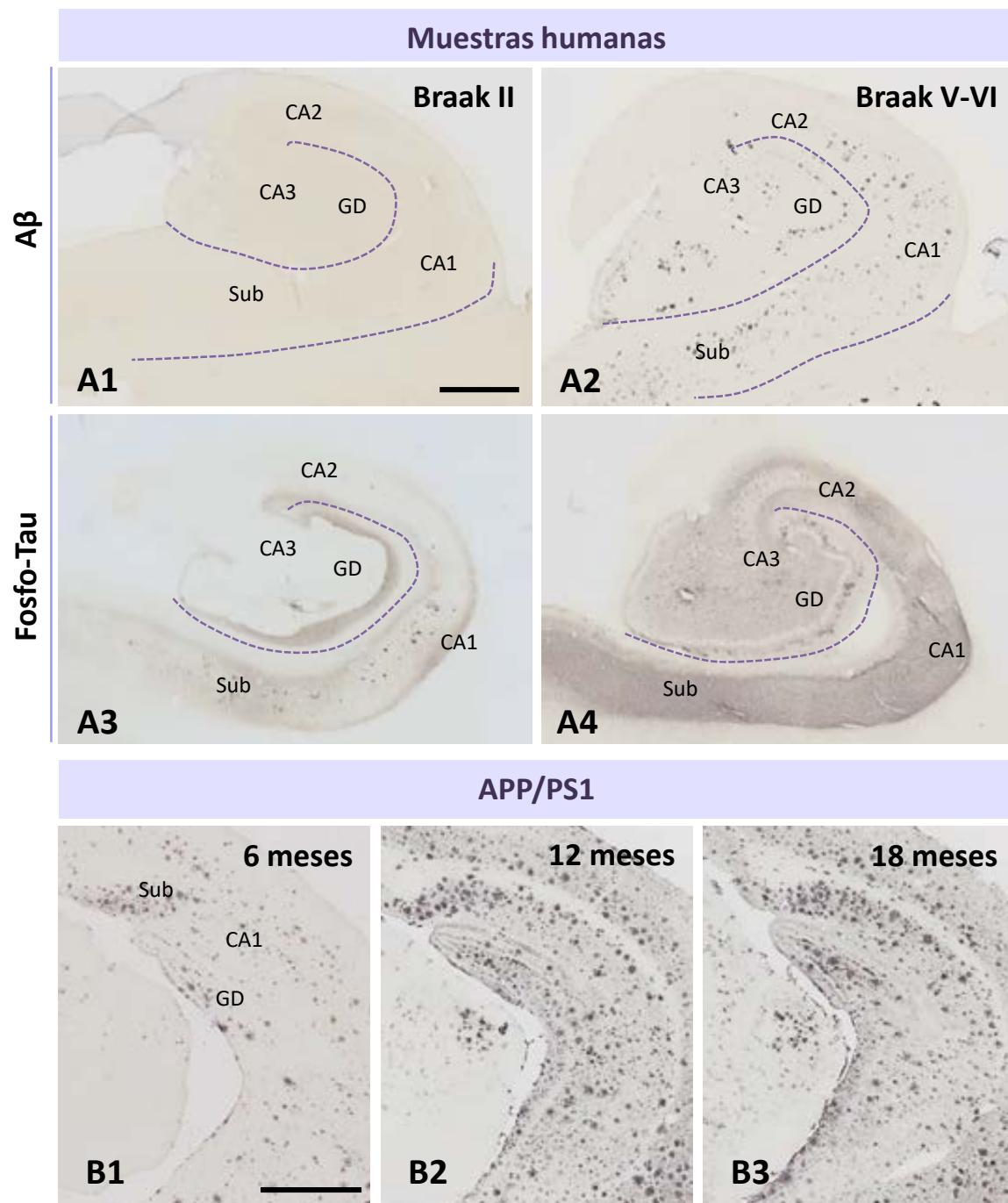


Figura 3.83. La patología amiloide en el hipocampo de pacientes de Alzheimer es menos acusada que en el modelo APP/PS1. **A1-A2**, inmunohistoquímica a campo claro para Aβ oligomérico (anticuerpo OC) en muestras humanas. En individuos sin signos neurológicos (Braak II), hay pocas o ninguna placa amiloide en el hipocampo (A1), la patología amiloide se hace patente en esta región en los pacientes con demencia (A2: Braak V-VI). **A3-A4**, la inmunohistoquímica a campo claro para fosfo-Tau (AT8) en muestras humanas revela un incremento de la patología neurofibrilar entre los estadios Braak II (A3) y Braak V-VI (A4). **B**, inmunohistoquímica a campo claro para Aβ oligomérico (OC) en el modelo animal APP/PS1. Se observa que las placas comienzan a acumularse a edades muy tempranas, aumentando la patología amiloide con la edad. CA1-3: regiones 1 y 3 del asta de Ammon, GD: giro dentado, Sub: subículo. Barras de escala: 2 mm (A) y 1 mm (B).

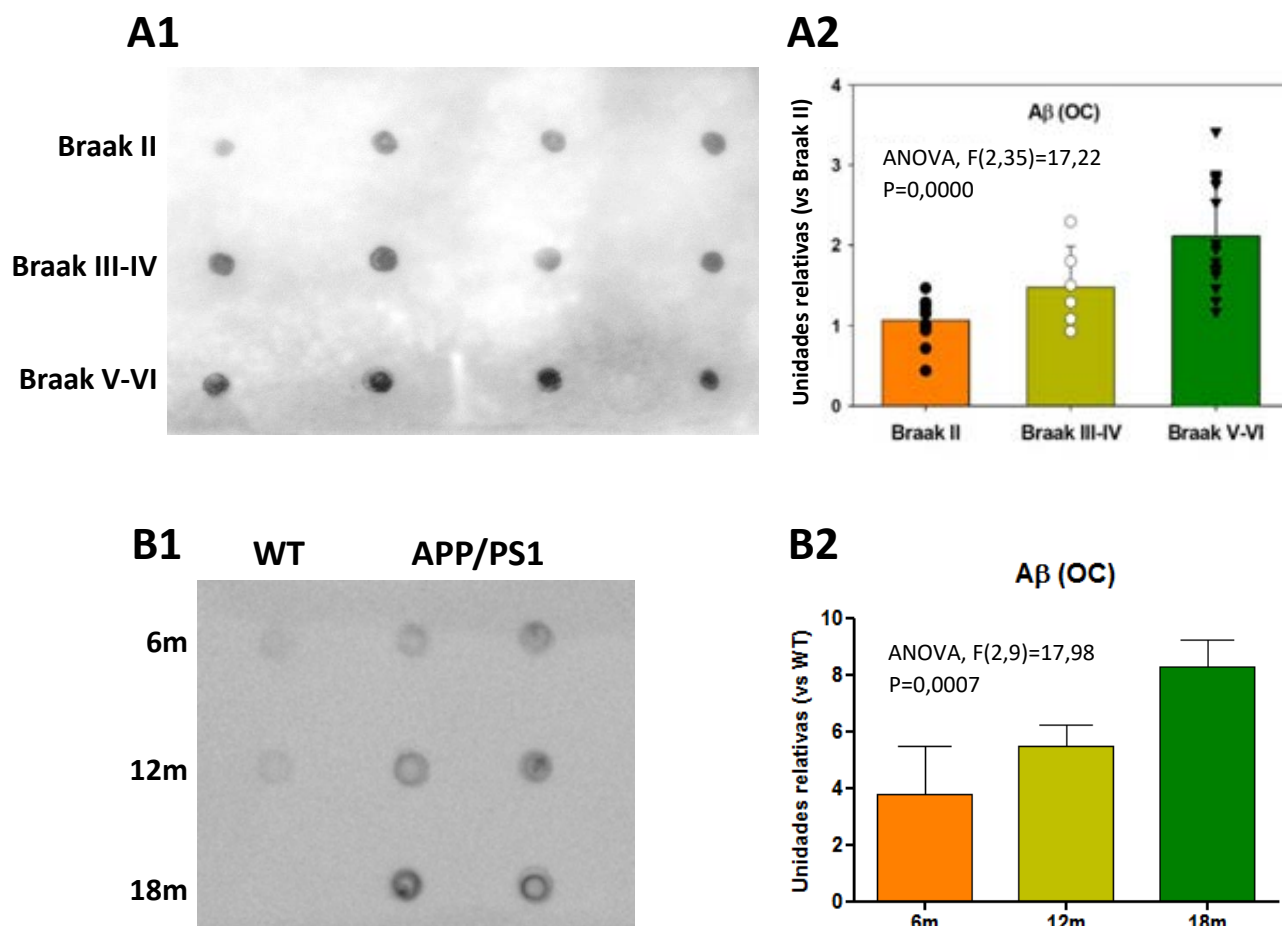


Figura 3.84. Detección de A β oligomérico en fracciones solubles S1 procedentes de muestras de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) y de ratones APP/PS1 de 18 meses. La presencia de oligómeros de A β se ha evaluado mediante dot blots empleando el anticuerpo anti-A β oligomérico (OC). En el caso de las fracciones solubles humanas, se observa que las muestras de pacientes Braak V-VI tenían una mayor cantidad de oligómeros OC-positivos que los individuos controles Braak II (**A1** y **A2**). En los animales transgénicos APP/PS1 también se detectan oligómeros positivos para OC, siendo éstos más abundantes a los 18 meses de edad (**B1** y **B2**). En los animales silvestres no se detectan oligómeros OC-positivos. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica (datos tomados de Sánchez-Mejías et al., 2016). Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en las gráficas.

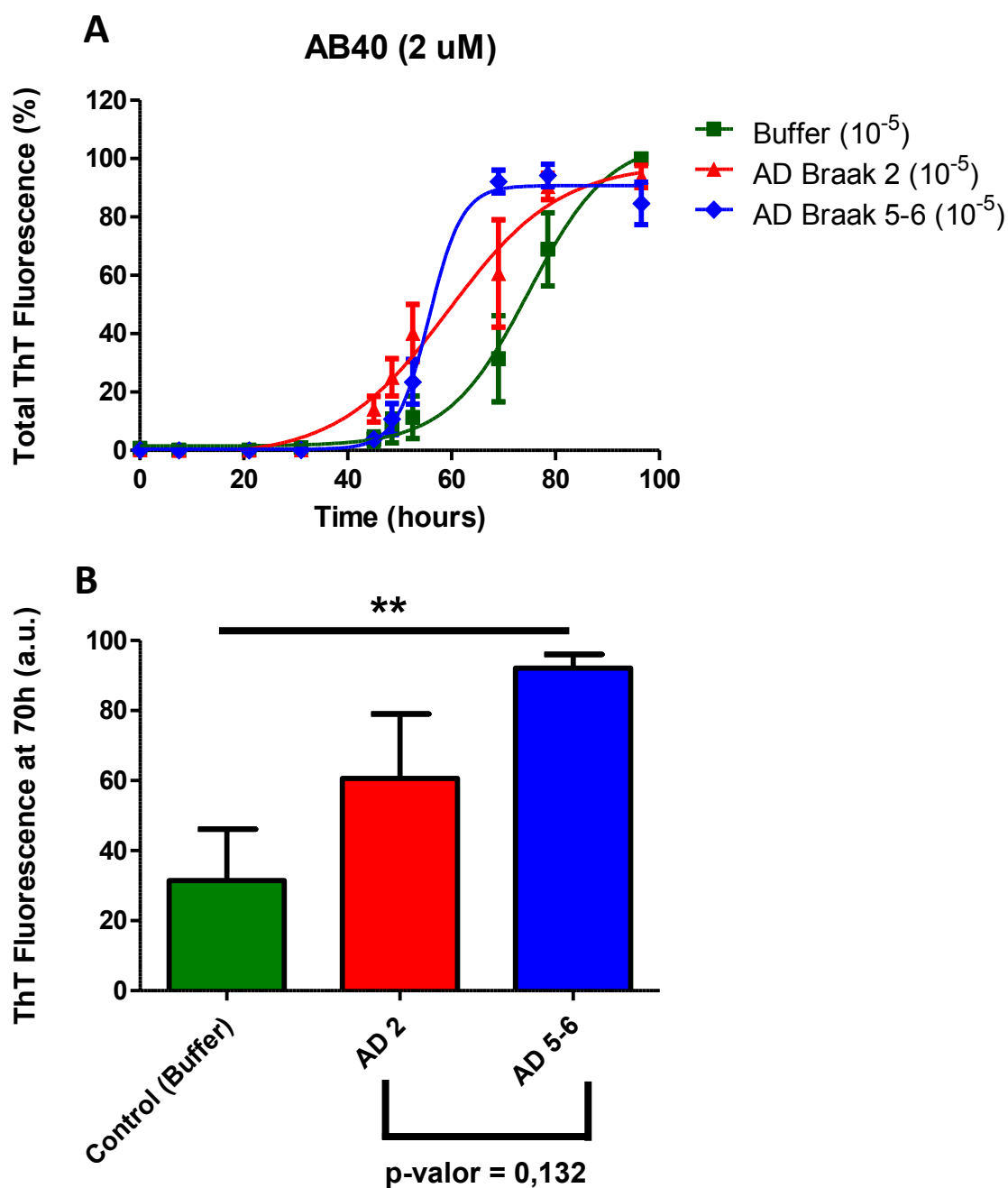


Figura 3.85. Ensayo de agregación *in vitro* de muestras S1 procedentes de pacientes de Alzheimer. Se incubaron las muestras de individuos Braak II (controles) y pacientes de Alzheimer Braak V-VI diluidas 10^{-5} junto con $A\beta_{40}$ 2 μ M y Tioflavina-T para determinar la capacidad de agregación de las muestras mediante la detección de la fluorescencia emitida. Las curvas de fluorescencia a distintos tiempos (A) revelan que las muestras de pacientes agregan de forma más temprana que el control (buffer). Las muestras Braak II comienzan a agregar antes, pero las muestras Braak V-VI tienen una pendiente más pronunciada una vez que comienza la agregación. A las 70h del inicio de la reacción (B), la cantidad de fluorescencia es significativamente mayor en las muestras Braak V-VI con respecto al control. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD, ** $p < 0,01$. ThT: Tioflavina-T. Experimentos realizados por el laboratorio del Dr. Rodrigo Morales (Houston, USA).

pruebas se llevaron a cabo durante la misma hora del día y siguiendo un protocolo estandarizado para minimizar las variaciones entre animales. Para determinar posibles alteraciones motoras, se realizó la prueba de campo abierto (*open field*), midiéndose la distancia recorrida y la velocidad (Fig. 3.86). Los animales operados, independientemente del grupo experimental, presentaban una mayor velocidad de exploración de la arena ($p < 0,001$), tanto en el caso de los animales WT (PBS: $8,22 \pm 2,18 \text{ cm/s}$; S1-PS1/APP: $7,63 \pm 2,06 \text{ cm/s}$; S1-BraakV-VI: $7,55 \pm 1,30 \text{ cm/s}$; no operados: $2,91 \pm 0,74 \text{ cm/s}$), como los APP (PBS: $6,94 \pm 2,08 \text{ cm/s}$; S1-PS1/APP: $7,95 \pm 1,99 \text{ cm/s}$; S1-BraakV-VI: $7,27 \pm 2,47 \text{ cm/s}$; no operados: $3,56 \pm 0,31 \text{ cm/s}$). Por consiguiente, los animales operados también recorrían una mayor distancia que los animales no operados ($p < 0,001$), observándose el mismo patrón en los ratones WT (PBS: $2466 \pm 652,6 \text{ cm}$; S1-PS1/APP: $2289 \pm 616,9 \text{ cm}$; S1-BraakV-VI: $2263 \pm 390 \text{ cm}$; no operados: $872,6 \pm 222,4 \text{ cm}$) y en los transgénicos APP (PBS: $2081 \pm 623,6 \text{ cm}$; S1-PS1/APP: $2383 \pm 595,8 \text{ cm}$; S1-BraakV-VI: $2166 \pm 737,5 \text{ cm}$; no operados: $1069 \pm 91,46 \text{ cm}$). En la prueba de campo abierto, también se midió el tiempo transcurrido en la zona externa y la zona interna de la arena (Fig. 3.87), como indicador de estrés en los animales. No se obtuvieron diferencias en el tiempo que pasaban los animales en la zona externa e interna de la arena entre los distintos grupos experimentales. Por tanto, la operación/manipulación de los animales causó cambios en la actividad motora de los mismos. En el caso de los test cognitivos, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales y controles (datos no mostrados), y por tanto no hubo cambios sustanciales en la capacidad cognitiva.

A los 4 meses post-cirugía, y tras los estudios conductuales, cuando los animales tenían 8 meses de edad fueron sacrificados, y los cerebros perfundidos y procesados mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. El marcaje inmunohistoquímico con anti-A β oligomérico prefibrilar (OC) (Fig. 3.88), que marca las placas fibrilares y no fibrilares, reveló una mayor patología amiloide en el hipocampo de los animales APP inyectados con fracciones solubles de Braak V-VI (Fig. 3.88 A1-2) y de APP/PS1 de 18 meses (Fig. 3.88 B1-2) en comparación con los inyectados con PBS (Fig. 3.88 C1-2). A nivel cualitativo, no se observaron grandes diferencias en la cantidad de placas del hemisferio ipsilateral (inyectado) y el contralateral (no inyectado), sin embargo, se detectó una alta acumulación de depósitos OC-positivos en la región del *alveus* del hemisferio inyectado (ipsilateral) con fracciones solubles. Además, no parecen existir diferencias en el tipo de agregación (difusa vs. fibrilar), tamaño de la placa o localización (parenquimal vs. perivascular) de las mismas. Al cuantificar el área OC-positiva (carga amiloide) en el hipocampo de estos animales por análisis de imagen (Fig. 3.89 A), se obtuvo que los ratones inyectados con S1 de pacientes Braak V-VI tenían una carga amiloide significativamente mayor que los inyectados con PBS ($F(2,27)=11,31$, $P=0,0003$), con un incremento de la carga amiloide del $74,14 \pm 45,32\%$ ($p < 0,001$). Además, en los animales inyectados con S1 de APP/PS1 de 18 meses también se daba una mayor carga amiloide respecto a los inyectados con PBS, con un incremento del $44,12 \pm 34,35\%$ ($p < 0,05$). Al estudiar específicamente la carga amiloide en la región CA1 (Fig. 3.89 B) ($F(2,23)=16,37$, $P < 0,0001$), se obtuvo que esta incrementaba significativamente en el grupo inyectado con S1 de Braak V-VI con respecto a los inyectados con S1 de APP/PS1 de 18 meses (incremento del $29,94 \pm 28,27\%$, $p < 0,05$) y los inyectados con PBS (incremento del $77,72 \pm 38,67\%$, $p < 0,001$). Además, los inyectados con S1 de APP/PS1 también presentaban una carga amiloide mayor que los inyectados con PBS (incremento del $36,77 \pm 18,92\%$). Al cuantificar por separado la carga

Open Field

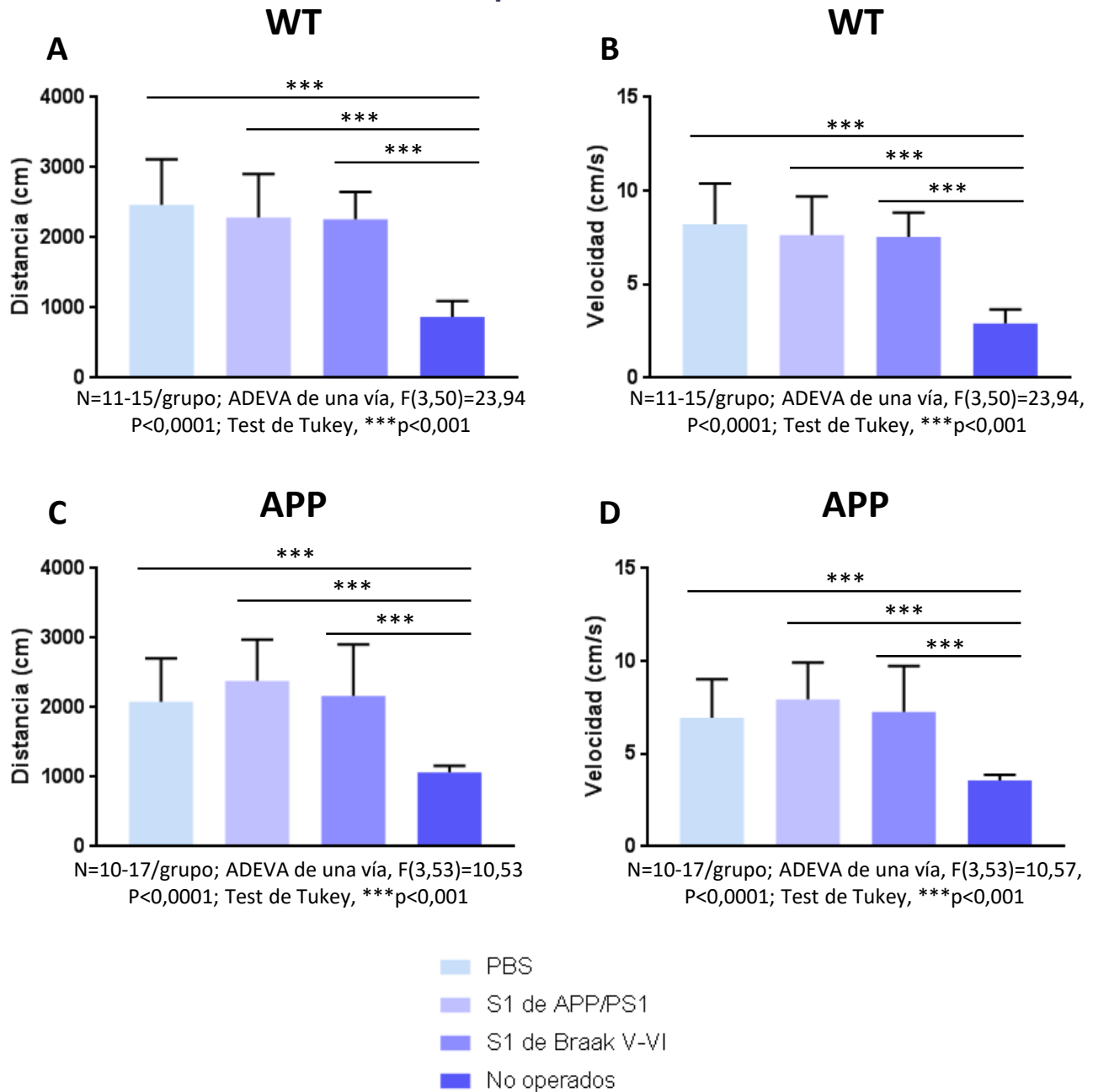


Figura 3.86. Estudios conductuales. Distancia recorrida y velocidad en la prueba de campo abierto (open field). Los animales WT (A-B) y APP (C-D) realizaron la prueba a los 3 meses post-inyección, analizando la distancia recorrida (A y C) y la velocidad (B y D). Los ratones no operados recorren una distancia significativamente menor en comparación con los animales inyectados, presentando también una menor velocidad de exploración de la arena. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en las gráficas.

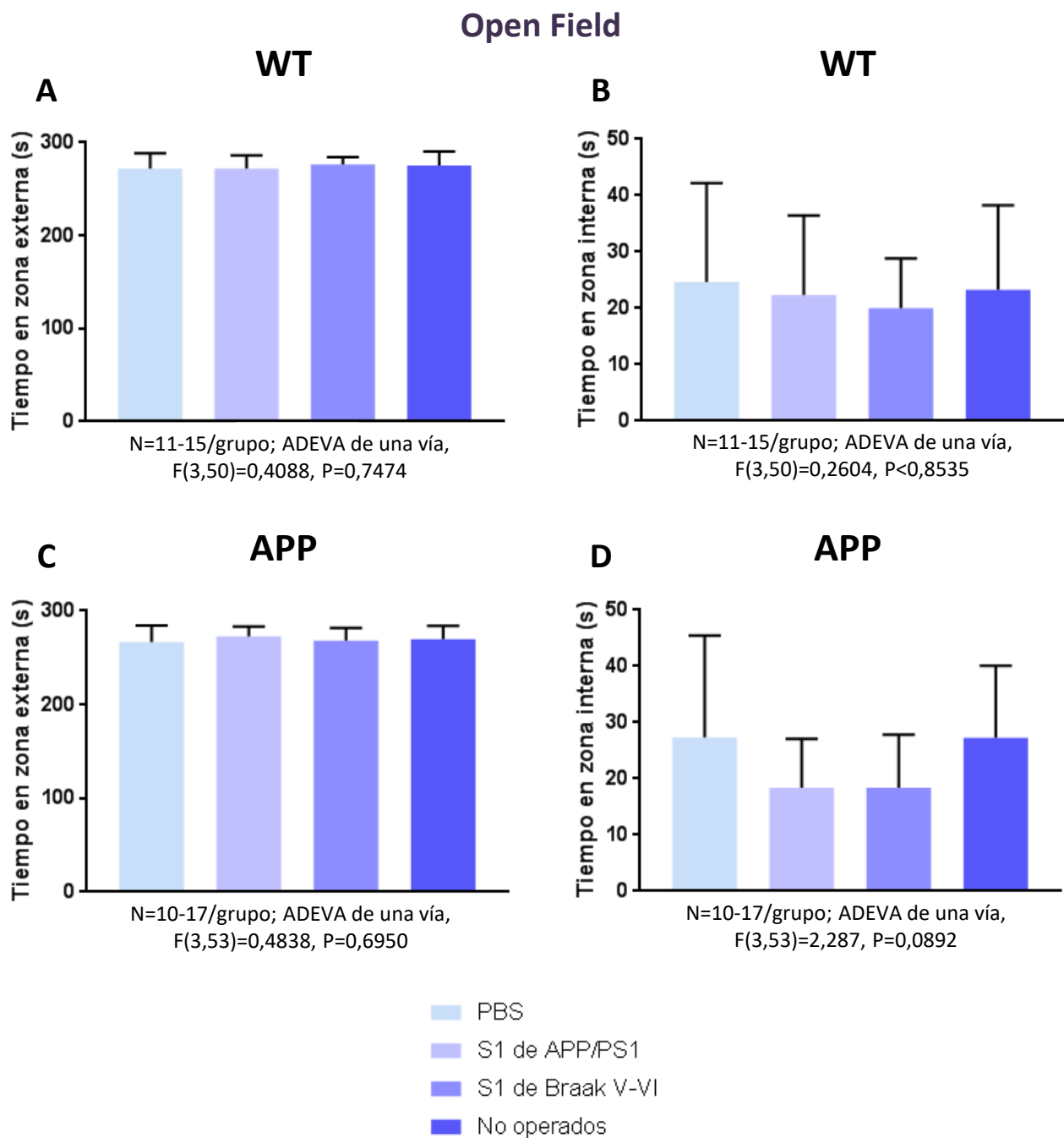


Figura 3.87. Estudios conductuales. Tiempo pasado en la zona externa e interna en la prueba de campo abierto (open field). Los animales WT (A-B) y APP (C-D) llevaron a cabo la prueba conductual 3 meses después de la inyección intracerebral, analizándose el tiempo que los ratones permanecían en la zona externa (A y C) y en la zona interna (B y D) de la arena. No se observan cambios entre los distintos grupos experimentales para ninguno de los dos genotipos. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en las gráficas.

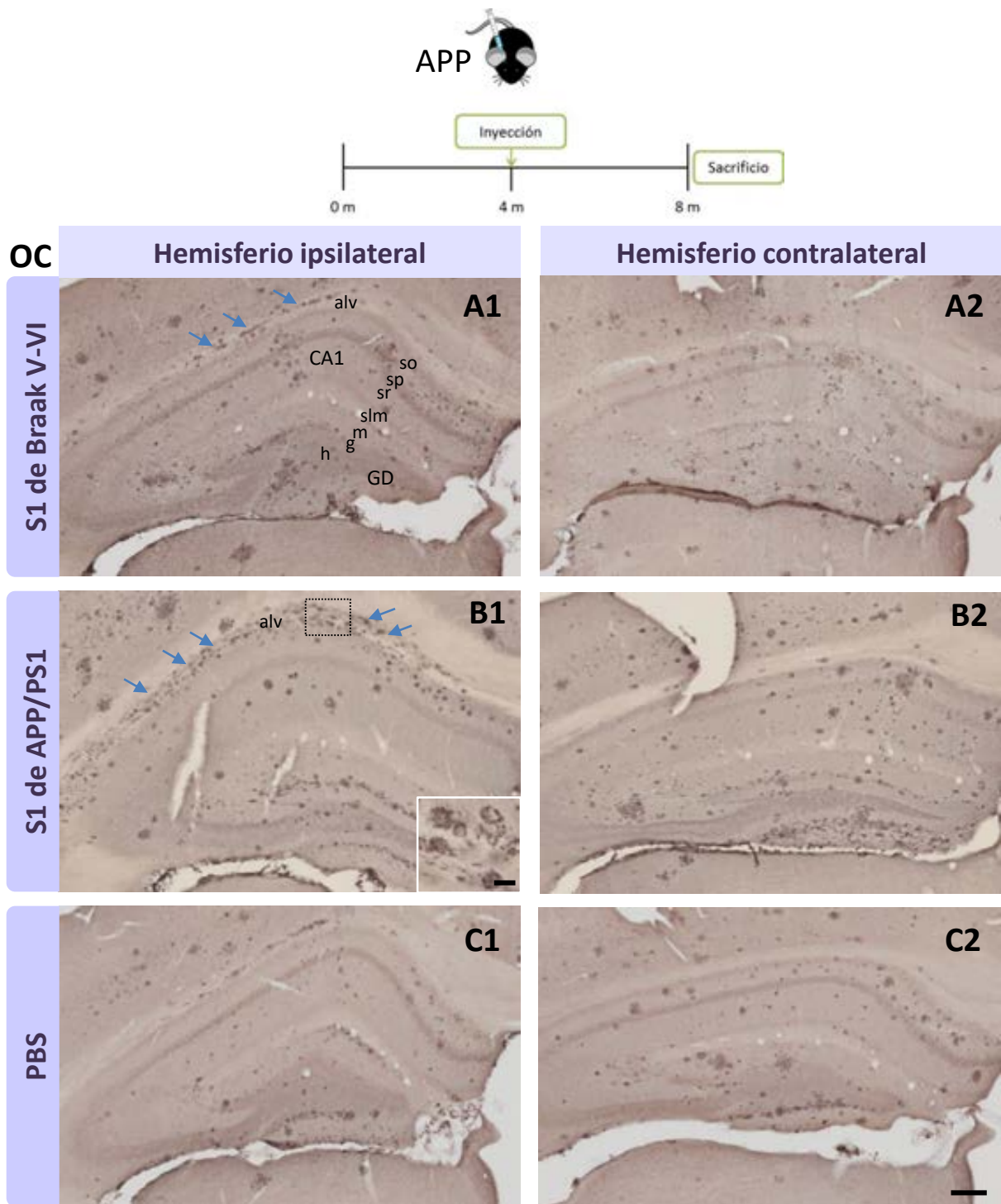


Figura 3.88. La patología amiloide se acelera en el hipocampo de ratón APP tras 4 meses post-inyección de la fracción S1 de pacientes de Alzheimer. A-C, inmunohistoquímica para A β oligomérico (OC) en el hipocampo de animales APP de 8 meses inyectados con la fracción soluble de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) (A), de ratones APP/PS1 (B) y con PBS (C) (4 meses post-inyección). Los animales inyectados con fracciones solubles de individuos Braak V-VI y de ratones APP/PS1, así como los inyectados con PBS, presentan depósitos extracelulares de A β . Los animales inyectados con fracciones S1 de pacientes y de APP/PS1 muestran una mayor cantidad de depósitos. Destaca la concentración de acúmulos positivos (flechas azules) en el alveus (hipocampo ipsilateral) de los animales inyectados con S1 (ver detalle inserto en B1). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado, alv: *alveus*, so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum-moleculare*, g: capa granular, h: hilio, m: capa molecular. Barra de escala: 200 μ m (A, B y C) y 50 μ m (inserto en B1).

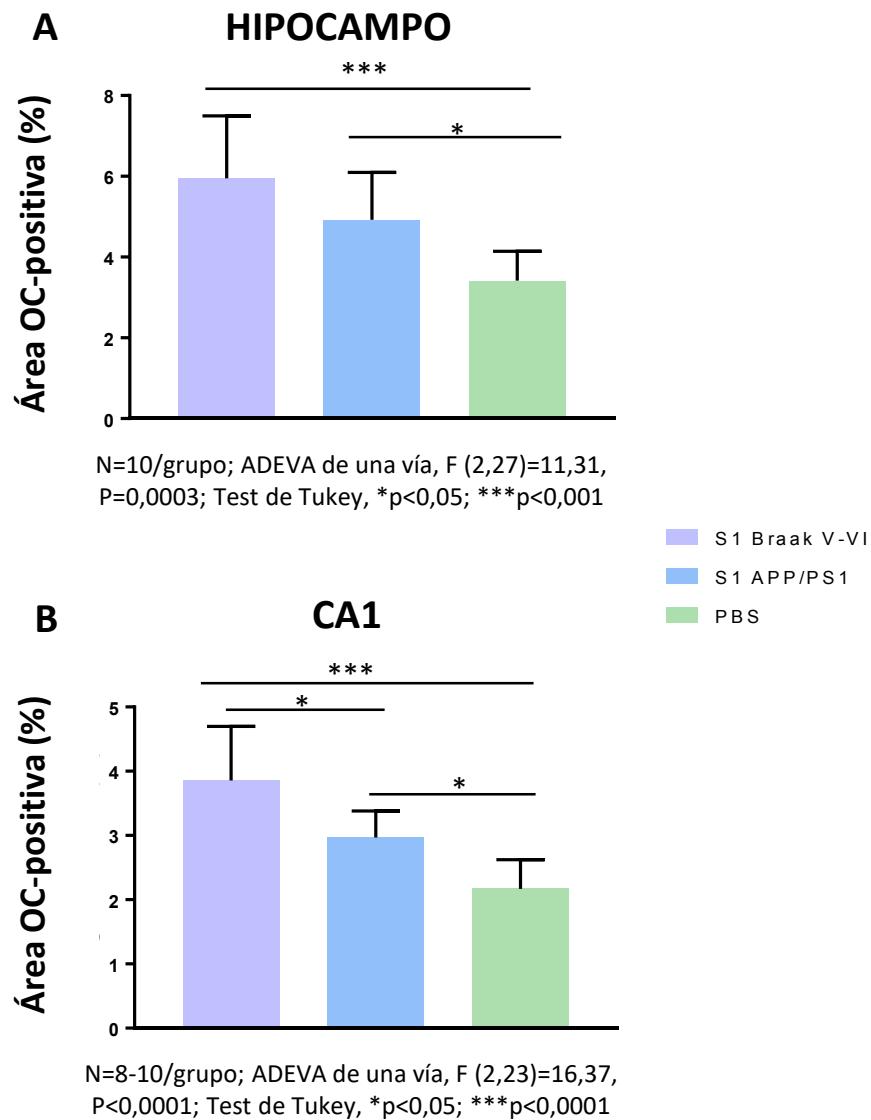


Figura 3.89. La inyección intracerebral de la fracción S1 de pacientes de Alzheimer y de APP/PS1 acelera la patología amiloide en el hipocampo del modelo APP. Análisis de la carga amiloide con el marcador OC en el hipocampo (A) y la región CA1 hipocámpal (B) de animales APP de 8 meses inyectados intracerebralmente con fracciones solubles de individuos Braak V-VI, APP/PS1 y con PBS (4 meses post-inyección). El estudio cuantitativo de la carga amiloide en el hipocampo (A) revela que los animales inyectados con fracción soluble S1 procedente de individuos Braak V-VI y de APP/PS1 presentan una carga amiloide significativamente mayor que los inyectados con PBS. El estudio más detallado en la región CA1 (B) revela que los animales inyectados con S1 humano tienen una carga amiloide significativamente mayor que los inyectados con S1 de APP/PS1 y con PBS. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en las gráficas.

amiloide para OC en el hemisferio ipsilateral y contralateral para cada una de las condiciones experimentales, no se observaron diferencias entre ambos hemisferios (datos no mostrados), ni en los animales inyectados con PBS ni en los inyectados con fracciones solubles. En los ratones silvestres (WT), la inyección intracerebral de la fracción soluble S1 de Braak V-VI y la procedente de ratones APP/PS1 no resultó en la formación de placas amiloides OC-positivas (Fig. 3.90), al igual que se observa en el grupo inyectado con PBS. No se observaron diferencias entre el hemisferio inyectado (ipsilateral) y el no inyectado (contralateral).

A continuación, se analizó el efecto de las inyecciones estereotáxicas de A β soluble humano y de ratón APP/PS1 sobre la cantidad de placas amiloides de tipo fibrilar Tioflavina S-positivas en el modelo APP (Fig. 3.91). Se observó que los animales APP inyectados con la fracción S1 de Braak V-VI y de APP/PS1 de 18 meses presentaban una cantidad significativamente mayor de este tipo de placas que los animales inyectados con PBS. Además, al igual que ocurría con los depósitos OC-positivos, en el hemisferio ipsilateral de los animales inyectados con fracciones solubles había una llamativa acumulación de placas fibrilares en el *alveus* (capa de sustancia blanca formada por los axones mielínicos eferentes de neuronas piramidales hipocampales que cursan por la superficie ventricular, ver inserto). El análisis cuantitativo de la carga de depósitos fibrilares para Tioflavina-S en el hipocampo (Fig. 3.92) puso de manifiesto que dicha carga se incrementaba en los animales inyectados con S1 de Braak V-VI y de APP/PS1 de 18 meses en comparación con los inyectados con PBS (S1 de Braak V-VI: $1,76 \pm 0,80$ veces, $p < 0,01$; S1 de APP/PS1: $2,16 \pm 0,51$ veces, $p < 0,001$) ($F(2,42) = 14,95$, $P < 0,0001$). La carga de placas amiloides fibrilares fue ligeramente mayor en el caso de los animales inyectados con S1 de APP/PS1 en comparación con los inyectados con S1 de Braak V-VI. Al cuantificar por separado la carga amiloide para Tioflavina-S en el hemisferio ipsilateral y contralateral para cada una de las condiciones experimentales, no se observaron diferencias entre ambos hemisferios (datos no mostrados), ni en los animales inyectados con PBS ni en los inyectados con fracciones solubles.

Tras detectar cambios en las placas amiloides de tipo fibrilar debidos a las inyecciones, se procedió a comprobar si dichos cambios también se reflejaban en la respuesta microglial, ya que la microglía reactiva se encuentra rodeando a las placas amiloides fibrilares. Mediante inmunohistoquímica para el marcador CD45 (Fig. 3.93), que se expresa en la microglía activada alrededor de las placas amiloides, se apreciaron de forma cualitativa diferencias entre los grupos experimentales y controles, existiendo una mayor inmunotinción en el caso de los animales inyectados con S1 de Braak V-VI o con S1 de APP/PS1. Además, se observaba activación microglial en la zona del *alveus*, probablemente asociada con la presencia de placas fibrilares en esta región. La cuantificación del área marcada con anti-CD45 en el hipocampo (Fig. 3.94) confirmó esta apreciación. Tanto el grupo inyectado con S1 de pacientes como el inyectado con S1 de APP/PS1 mostraron un aumento en el área ocupada por la microglía CD45-positiva (S1 de Braak V-VI: $1,39 \pm 0,33$ veces, $p < 0,05$; S1 de APP/PS1: $1,72 \pm 0,65$ veces, $*p < 0,05$) en comparación con el grupo control inyectado con PBS ($F(2,24) = 5,232$, $P = 0,0130$). Esta carga microglial fue ligeramente mayor en el caso de los animales inyectados con S1 de APP/PS1. La inmunotinción con el anticuerpo para CD45 (figura 3.95) en los animales WT reveló que no ocurría activación microglial en el hipocampo en ninguna de las tres condiciones experimentales (grupos inyectados con S1 Braak V-VI, con S1 APP/PS1 o con PBS).

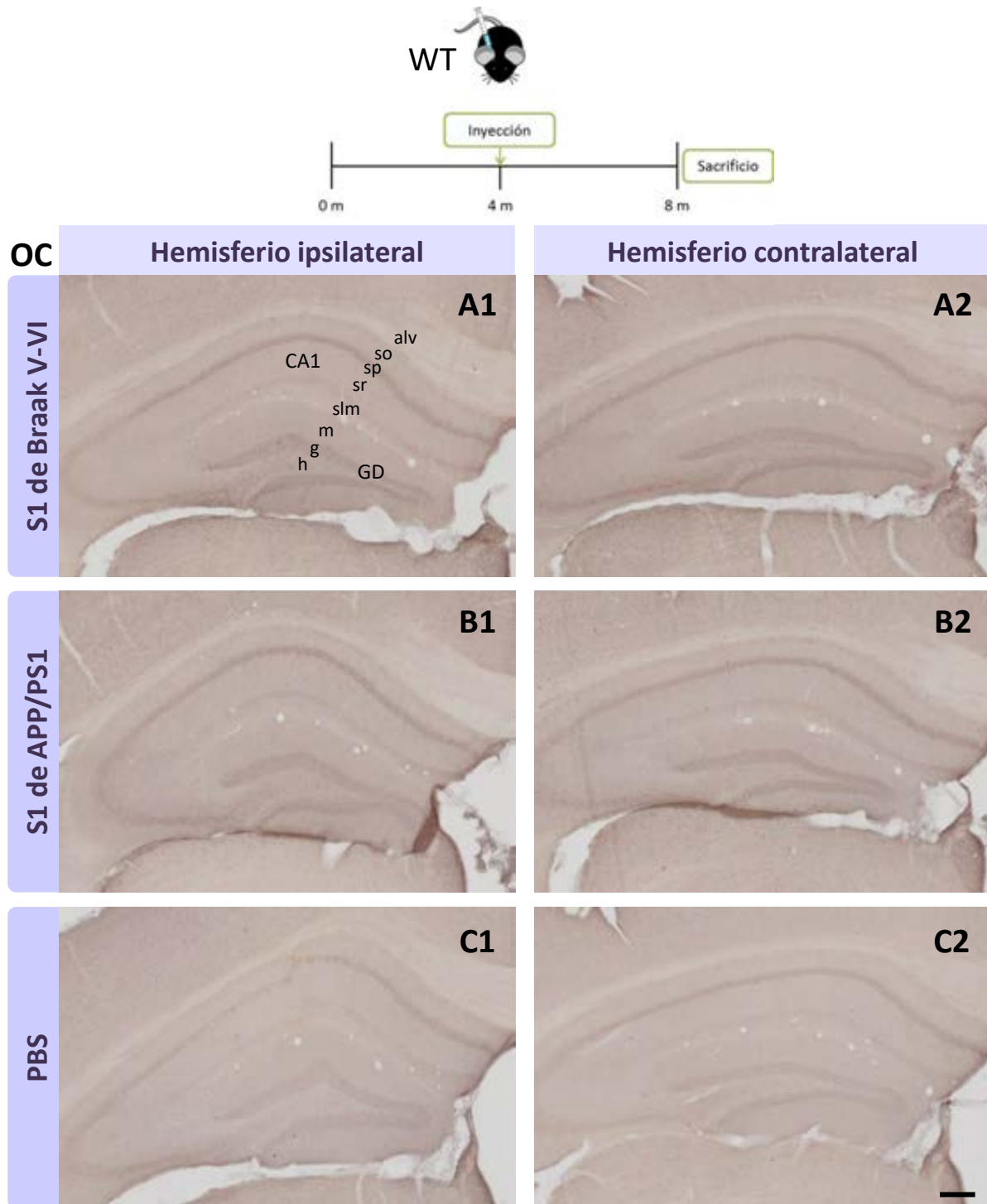


Figura 3.90. Los animales WT no desarrollan patología amiloide tras 4 meses de la inyección intrahipocampal de S1 de pacientes de Alzheimer o de ratones APP/PS1. Inmunohistoquímica para A β oligomérico (OC) en el hipocampo de animales WT de 8 meses de edad inyectados con la fracción soluble de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) (A), de ratones APP/PS1 (B) y con PBS (C) (4 meses post-inyección). En ninguna de las condiciones experimentales se observa inmunomarcado positivo para este anticuerpo, no existiendo por tanto depósitos de A β extracelular ni en el hemisferio inyectado (A1-C1) ni en el hemisferio contralateral (A2-C2). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado, alv: *alveus*, so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum-moleculare*, g: capa granular, h: hilio, m: capa molecular. Barra de escala: 200 μ m.

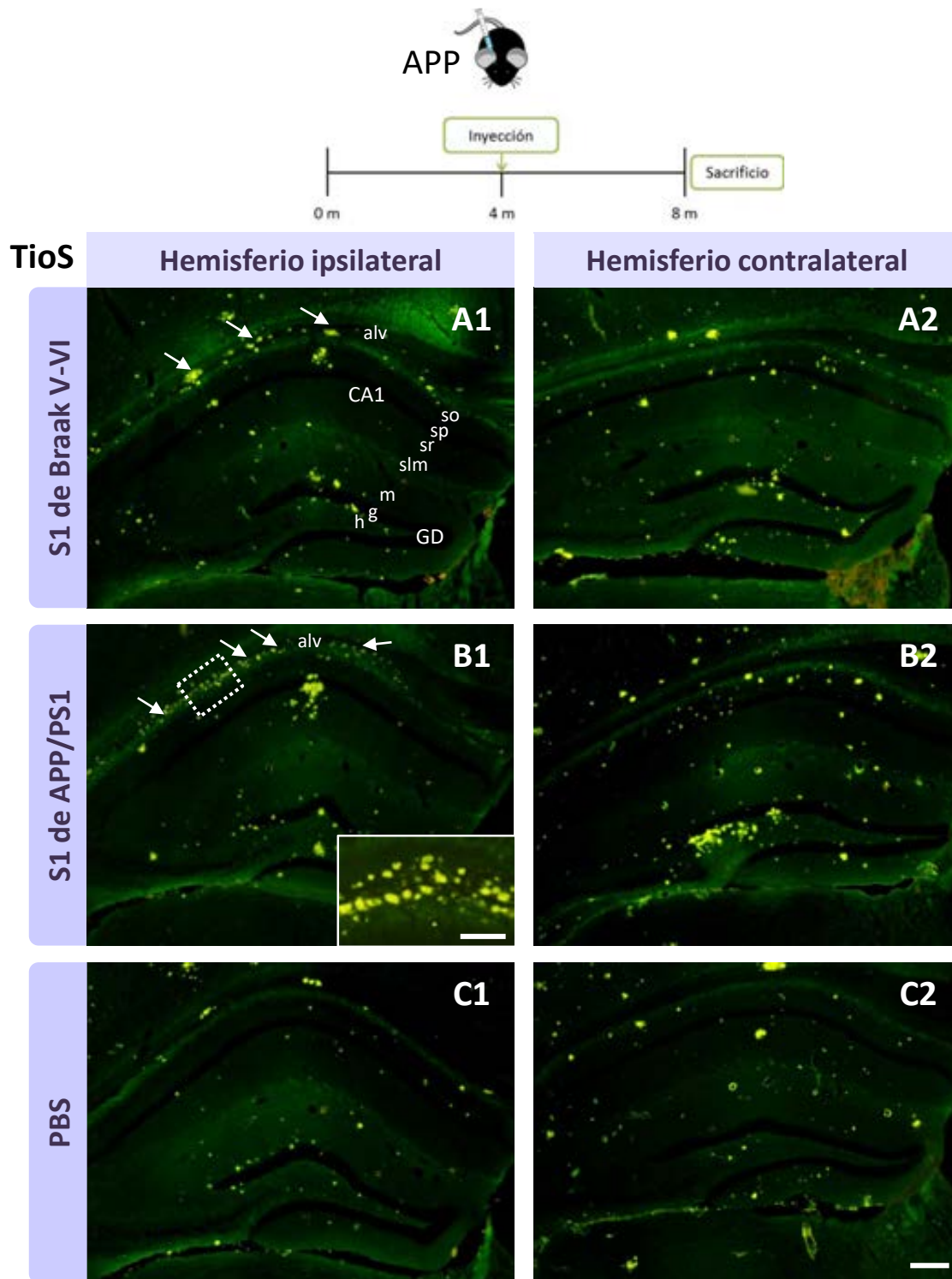


Figura 3.91. La inyección de S1 de pacientes y de APP/PS1 agrava la patología amiloide fibrilar. A-C, tinción con Tioflavina-S en el hipocampo de animales APP de 8 meses de edad inyectados con la fracción soluble de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) (**A**), de ratones APP/PS1 (**B**) y con PBS (**C**) (4 meses post-inyección). En todas las condiciones experimentales se observan placas de tipo fibrilar positivas para Tioflavina-S, y en mayor número en los grupos inyectados con S1. Destaca la acumulación de depósitos fibrilares (flechas blancas) en la región del *alveus* (hipocampo ipsilateral) de los animales inyectados con S1 (ver detalle inserto en B1). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado, alv: *alveus*, so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum-moleculare*, g: capa granular, h: hilio, m: capa molecular. Barra de escala : 200 μ m (A, B y C) y 100 μ m (inserto en B1).

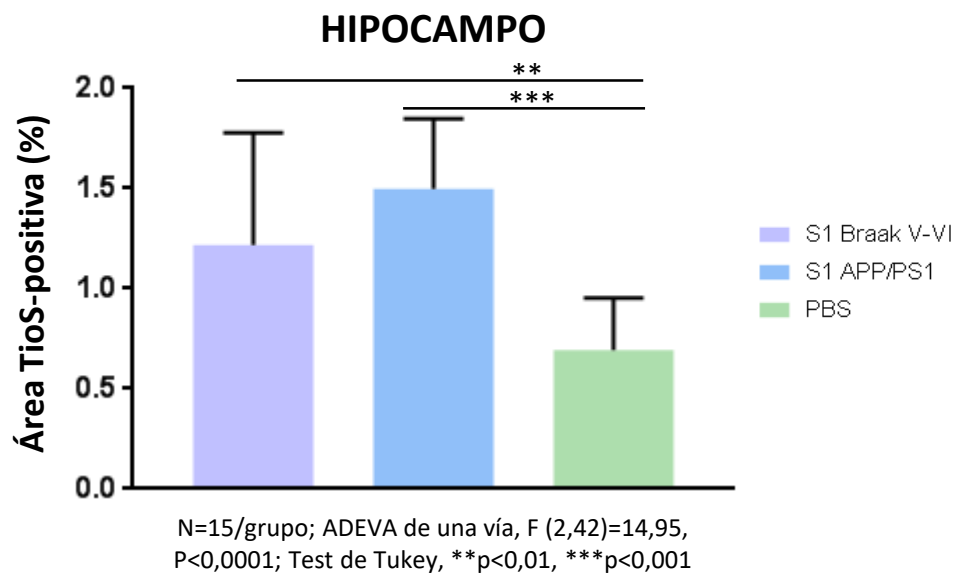


Figura 3.92. La patología amiloide fibrilar aumenta en el hipocampo de animales APP inyectados con S1 de Braak V-VI y de APP/PS1 de 18 meses de edad. Análisis del área Tioflavina-S positiva en el hipocampo de animales APP de 8 meses inyectados con S1 de Braak V-VI, de APP/PS1 y con PBS (4 meses post-inyección). El estudio cuantitativo del área Tioflavina-S positiva revela que los animales inyectados con fracción soluble de Braak V-VI y de APP/PS1 de 18 meses presentan una carga amiloide significativamente mayor que los inyectados con PBS. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en la gráfica.

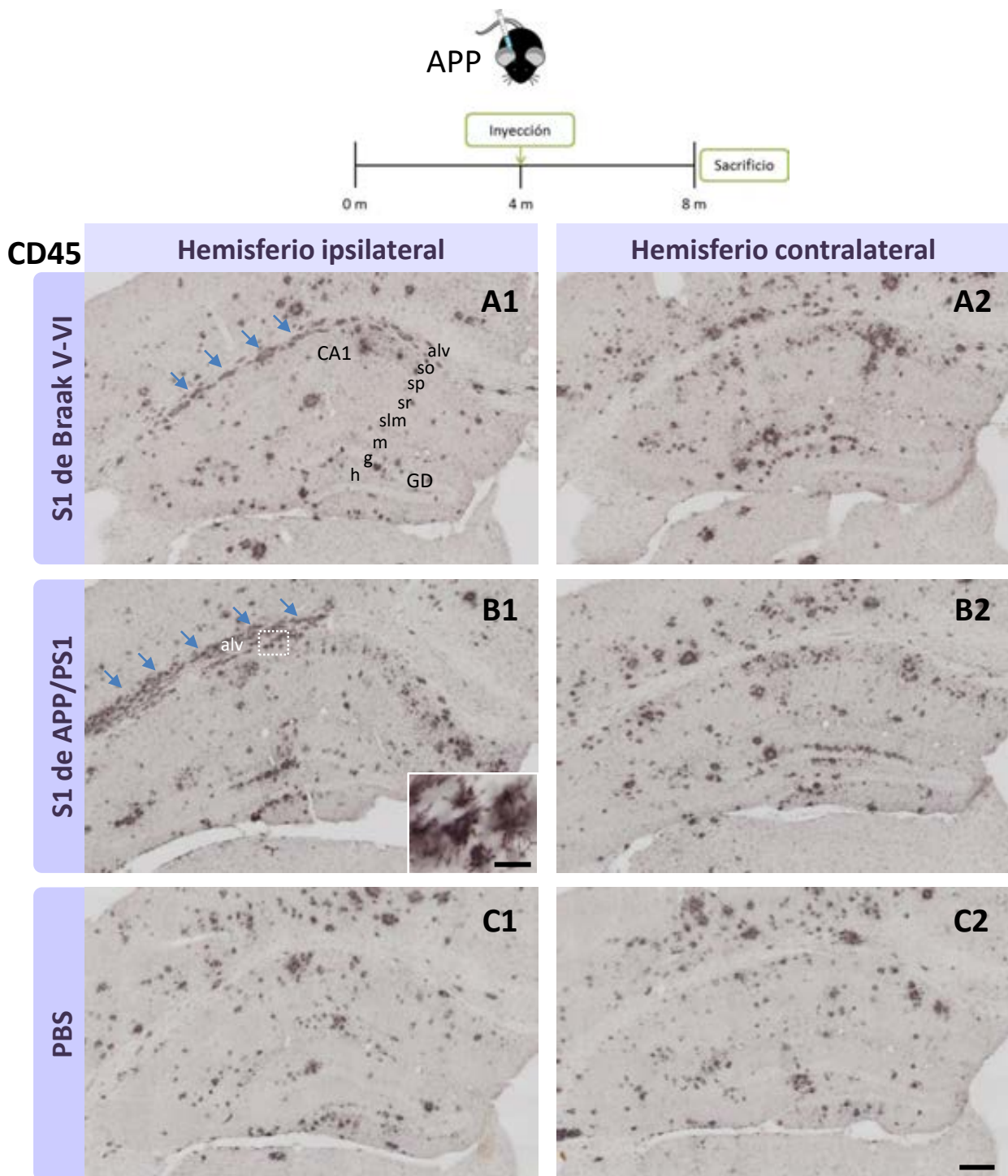


Figura 3.93. Las fracciones S1 de pacientes de Alzheimer y de APP/PS1 estimulan la respuesta microglial. A-C, inmunohistoquímica para CD45 en el hipocampo de animales APP de 8 meses inyectados con la fracción soluble de pacientes Braak V-VI (A), la fracción soluble de ratones APP/PS1 (B) y con PBS (C) (4 meses post-inyección). Se observa activación microglial en todas las condiciones experimentales, tanto en el hemisferio inyectado (A1-C1) como en el hemisferio contralateral (A2-C2), aunque en mayor medida en los grupos inyectados con S1. Destaca la gran acumulación de microglía activada (flechas azules) en la región del *alveus* (hipocampo ipsilateral) de los animales inyectados con S1 (ver detalle inserto en B1). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado, alv: *alveus*, so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum-moleculare*, g: capa granular, h: hilio, m: capa molecular. Barra de escala: 200 μ m (A, B y C) y 20 μ m (inserto en B1).

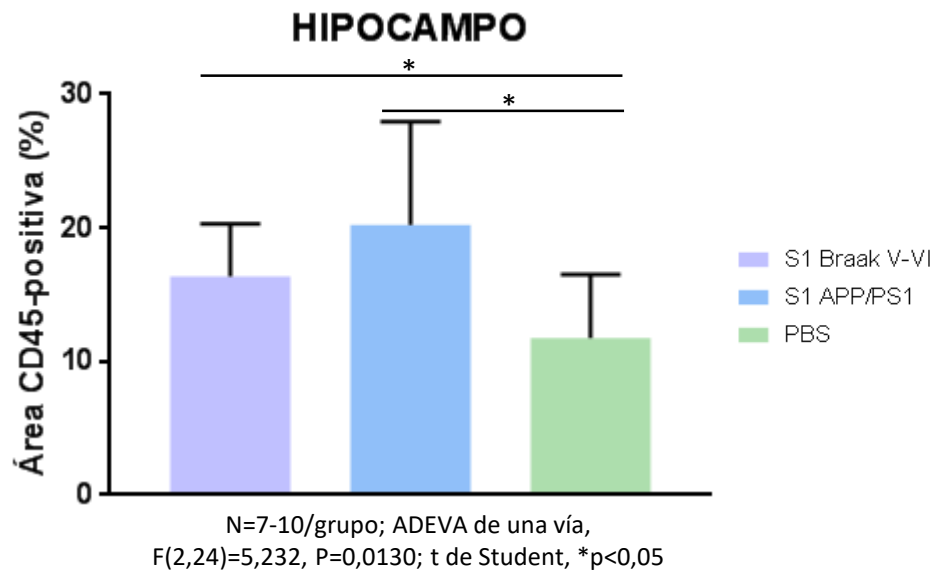


Figura 3.94. Aumento significativo de la respuesta microglial en el hipocampo de animales APP inyectados con S1 de pacientes y con S1 de APP/PS1. Análisis del área CD45-positiva en el hipocampo de animales APP de 8 meses inyectados con fracciones solubles Braak V-VI, APP/PS1 y con PBS (4 meses post-inyección). El estudio cuantitativo del área positiva para CD45 revela que los animales APP inyectados con las fracciones S1 de Braak V-VI y de APP/PS1 presentan una mayor carga de microglía activada que los inyectados con PBS. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. La estadística y significancia se indican en las gráficas.

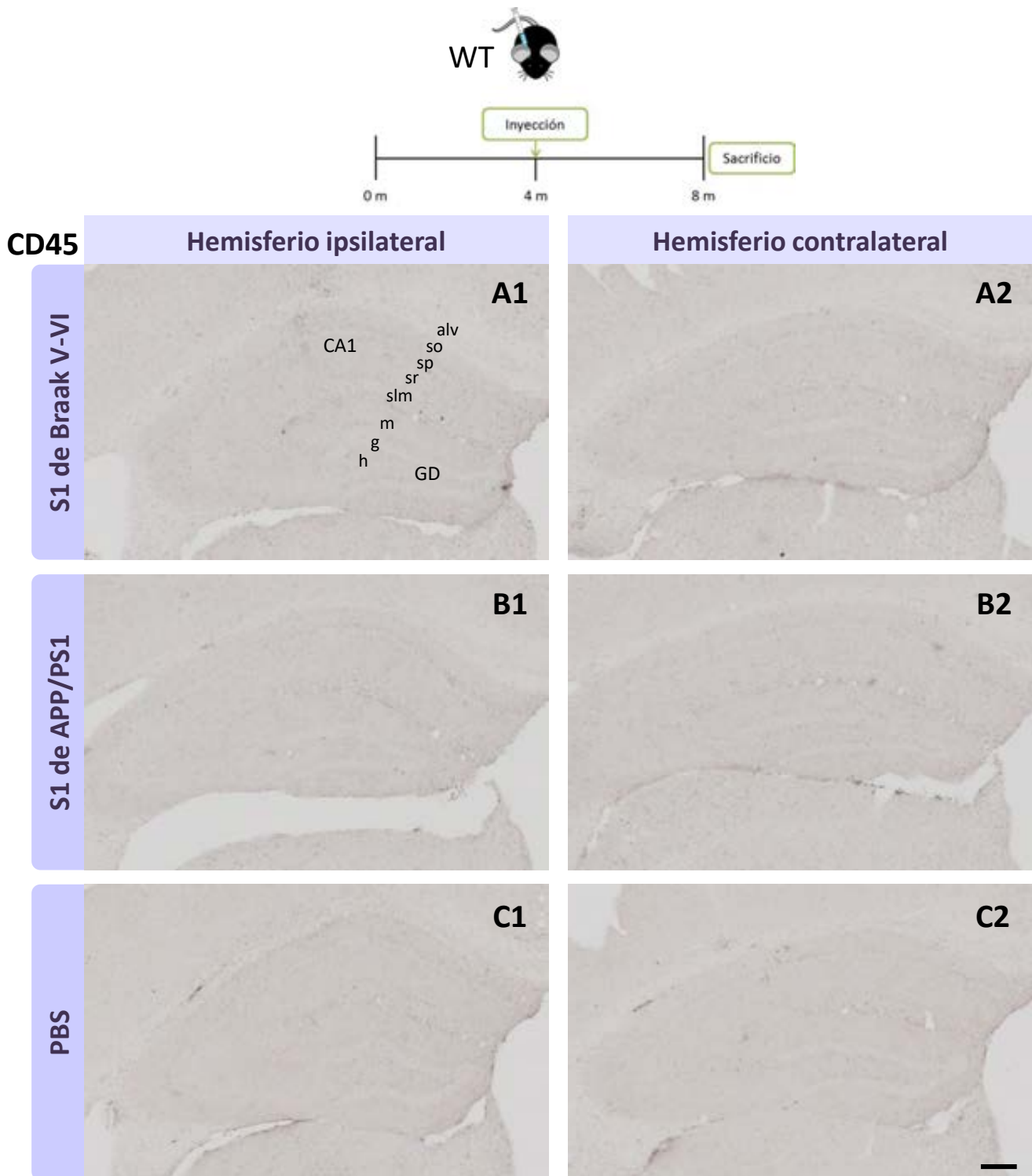


Figura 3.95. Las fracciones S1 de pacientes de Alzheimer y de APP/PS1 no inducen respuesta microglial *in vivo* en animales WT a los 4 meses post-inyección. Inmunohistoquímica para CD45 en el hipocampo de animales WT de 8 meses de edad inyectados con la fracción soluble de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) (**A**), de ratones APP/PS1 (**B**) y con PBS (**C**). Ninguna de las inyecciones produjo activación de la microglía, ni en el hemisferio inyectado (A1-C1) ni en el hemisferio contralateral (A2-C2). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado, alv: *alveus*, so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum-moleculare*, g: capa granular, h: hilio, m: capa molecular. Barra de escala: 200 μ m.

En resumen, estos resultados sugieren que las fracciones solubles, extraídas tanto de pacientes en estadios avanzados de Alzheimer (Braak V-VI) como de ratones amiloidogénicos viejos (APP/PS1 de 18 meses), contienen elevadas cantidades de A β oligomérico prefibrilar (OC-positivo), que tiene una gran capacidad de estimular *in vivo* la formación de agregados amiloides de tipo fibrilar (Tioflavina-S positivos) y la activación microglial asociada en el modelo APP. Además, en el caso de las fracciones solubles procedentes de pacientes, se ha comprobado que tienen la capacidad de inducir *in vitro* la formación de fibras amiloides.

3.3.2. LAS FRACCIONES SOLUBLES DE PACIENTES DE ALZHEIMER ACELERAN LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN LOS MODELOS 3xTgAD Y hA β -KI

Además del estudio realizado en animales silvestres y APP, se llevó a cabo un análisis *in vivo* del efecto de las fracciones solubles en dos modelos animales de la enfermedad de Alzheimer desarrollados en el laboratorio del Dr. Frank LaFerla, el modelo 3xTgAD, que es un modelo transgénico de la forma familiar y que desarrolla patología amiloide y patología Tau, y el modelo hA β -KI, que es un modelo recientemente desarrollado para la forma esporádica de la enfermedad. Los resultados de este capítulo fueron obtenidos en colaboración con dicho laboratorio en la Universidad de California (Irvine, EEUU) durante una estancia predoctoral.

En primer lugar, se llevó a cabo una caracterización inicial de las muestras empleadas para las inyecciones intracerebrales, las cuales procedían de la corteza frontal de un paciente de Alzheimer en estadio Braak VI. Mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se analizó la patología amiloide y neurofibrilar en el tejido del paciente (Fig. 3.96). En las inmunohistoquímicas para los marcadores 6E10 (reconoce A β total y formas precursoras), A β ₄₀ y A β ₄₂ (Fig. 3.96 A1-A3), se observó una elevada cantidad de placas amiloides en la corteza frontal, que tendían a acumularse en las capas superficiales (capas I-IV). La forma A β ₄₂ era más abundante que la forma A β ₄₀. Mediante inmunofluorescencia para 6E10, A β ₄₀ y A β ₄₂ combinada con tinción DAPI (marcador de núcleos) (Fig. 3.96 B1-B3), se detectó también la presencia de dichos depósitos extracelulares. Además, mediante inmunofluorescencia con marcadores de Tau fosforilado combinada con tinción con DAPI (Fig. 3.96 C1-C4), se observaron ovillos neurofibrilares positivos para los marcadores AT8, AT100, AT180 y PHF1, siendo más numerosas las formas positivas para AT180. Por otro lado, las fracciones solubles fueron también analizadas mediante *western blot* y *dot blot* (Fig. 3.97). El *western blot* con los marcadores 6E10 y 82E1 (Fig. 3.97 A1-A2), ambos para A β total y formas precursoras, indicó la presencia de dímeros de A β en las fracciones solubles. Con el marcador 82E1 se detectaron además tetrámeros en dichas muestras de corteza cerebral Braak VI. Mediante *dot blot* (Fig. 3.97 B1-B2), además de detectarse A β total y precursores con 6E10, se detectaron altos niveles de oligómeros de A β positivos para los marcadores dependientes de conformación A11 (oligómeros de A β de bajo peso molecular) y OC (oligómeros prefibrilares y fibrilares de A β).

Las fracciones solubles S1 de Braak VI caracterizadas fueron inyectadas en el hipocampo derecho de los modelos animales 3xTgAD y hA β -KI mediante cirugía estereotáxica. La operación se realizó cuando los animales tenían 7-8 meses de edad. Como control negativo, se inyectó PBS salino siguiendo el mismo protocolo quirúrgico que para la inyección de las fracciones solubles. Para cada modelo animal, se establecieron dos tiempos de incubación post-cirugía, de 5 y de 10 meses, tras los cuales se llevó a cabo el sacrificio y extracción del

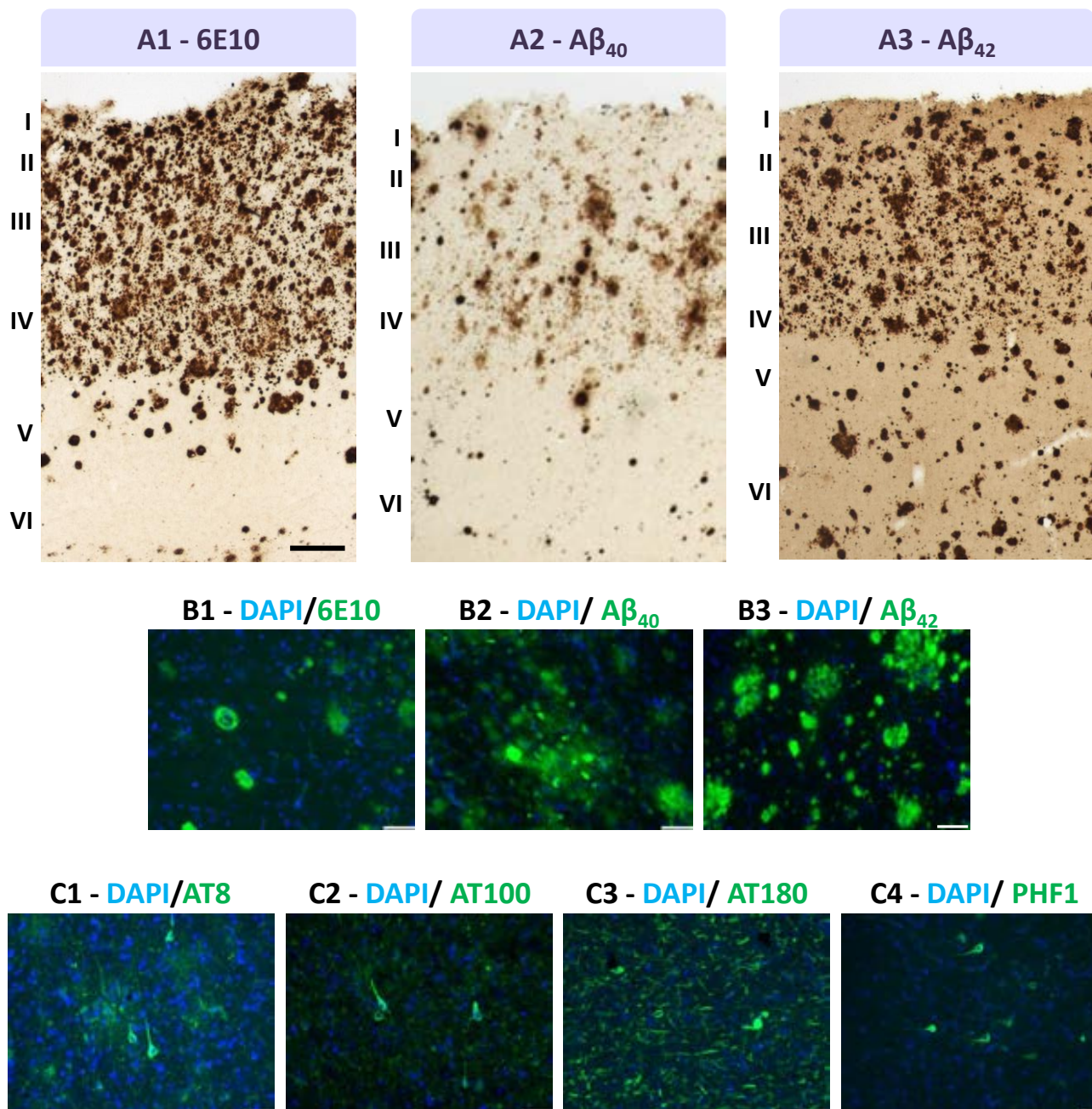


Figura 3.96. Estudio de la patología amiloide y neurofibrilar en la corteza frontal del paciente de Alzheimer Braak VI del que se ha obtenido la fracción soluble S1 para las inyecciones en ratones hAβ-KI y 3xTgAD. Mediante inmunohistoquímica (A) para los marcadores 6E10 (Aβ total) (A1), Aβ₄₀ (A2) y Aβ₄₂ (A3), se detecta la presencia de placas amiloides en la corteza frontal del paciente Braak VI (CERAD C), principalmente en las capas superficiales (I-IV). La inmunofluorescencia con distintos marcadores de Aβ (B1: 6E10, B2: Aβ₄₀, B3: Aβ₄₂; en verde) combinada con tinción con DAPI (tinción nuclear; azul) revela también la presencia de depósitos amiloides extracelulares. Mediante inmunofluorescencia con distintos marcadores de fosfo-Tau (C1: AT8, C2: AT100, C3: AT180, C4: PHF1, en verde) combinada con DAPI (azul) se observan ovillos neurofibrilares intraneuronales y filamentos pareados helicoidales. I-VI: capas corticales. Barras de escala: 250 μm (A1-A3) y 50 μm (B-C).

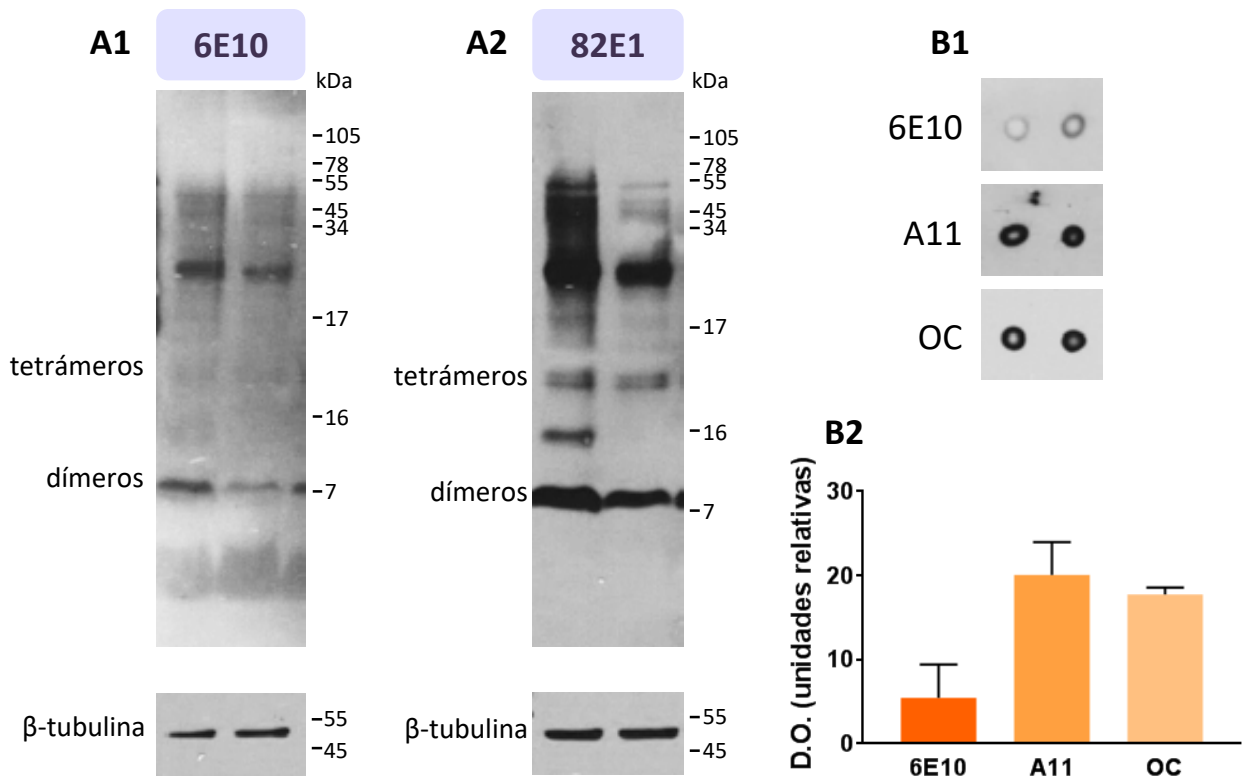


Figura 3.97. Detección de formas oligoméricas de A β en la fracción soluble del paciente Braak VI empleada en las inyecciones en ratones hA β -KI y 3xTgAD. Las fracciones solubles S1 obtenidas fueron analizadas mediante western blot empleando los marcadores de A β total 6E10 (**A1**) y 82E1 (**A2**), observándose la presencia de dímeros y tetrámeros de A β . Mediante dot blot se detectaron oligómeros de A β positivos para los marcadores 6E10, A11 y OC (**B1-B2**), siendo estos dos últimos marcadores de A β oligomérico. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD. kDa: kilodaltons, D.O.: densidad óptica.

cerebro de los animales para realizar un estudio de la patología amiloide mediante técnicas inmunohistoquímicas.

En el modelo 3xTgAD, a los 5 meses post-inyección, cuando los animales tenían 12-13 meses de edad, se analizaron posibles cambios en la patología amiloide mediante inmunotinción con el anticuerpo 6E10 (Fig. 3.98). Los animales inyectados con PBS (Fig. 3.98 A) presentaban escasas placas amiloides en el hipocampo ipsilateral, al igual que el hemisferio contralateral (no inyectado) de los animales inyectados con fracciones solubles (Fig. 3.98 B). Se observó una mayor cantidad de placas amiloides en el hemisferio inyectado con S1 Braak VI, estando estas presentes principalmente en la región CA1 (Fig. 3.98 C). De nuevo, pudo observarse un marcaje más intenso en la región del *alveus* y el cuerpo calloso, aunque no se observaron placas amiloides en dicha región. En este caso, también se encontraron algunos depósitos a nivel perivascular, como puede observarse en la imagen representativa en las capas profundas de la corteza cerebral. La cuantificación del área positiva para 6E10 mediante estereología reveló que existían diferencias significativas entre los animales inyectados con PBS y el hemisferio ipsilateral de los animales inyectados con fracciones solubles Braak VI ($n=5/\text{grupo}$, $F(2,12)=4,063$, $P=0,0449$), con un incremento del $72,70\pm 52,14\%$ en la carga amiloide ($p<0,05$) (Fig. 3.99). A continuación, se realizó un estudio de las placas amiloides de tipo fibrilar mediante el marcador Tioflavina-S (Fig. 3.100). La mayor parte de las placas amiloides fibrilares se encontraban en el subículo (Fig. 3.100 A1-3), y estas estaban presentes tanto en los animales inyectados con PBS como en los inyectados con fracciones solubles. En esta región, se llevó a cabo la cuantificación del número de placas totales (Fig. 3.100 B), no obteniéndose diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales ($n=5-6/\text{grupo}$, $F(2,13)=3,546$, $P=0,0590$). Sin embargo, sí se observó una tendencia a un menor número de placas en los animales inyectados con PBS. Al clasificar las placas por rangos de tamaño ($<200\mu\text{m}^3$, $200-500\mu\text{m}^3$, $500-1000\mu\text{m}^3$, $>1000\mu\text{m}^3$) (Fig. 3.100 C), se obtuvieron diferencias en cuanto a las placas de tamaño pequeño ($<200\mu\text{m}^3$), siendo estas más numerosas en los animales inyectados con fracciones solubles en comparación con los inyectados con PBS ($n=5-6/\text{grupo}$, $F(11,56)=7,203$, $P<0,0001$), tanto en el hemisferio ipsilateral ($2,33\pm 0,90$ veces, $p<0,001$), como en el contralateral ($2,49\pm 0,66$ veces, $p<0,001$).

En cuanto a los animales 3xTgAD analizados 10 meses después de las inyecciones (17-18 meses de edad), la inmunohistoquímica para 6E10 (Fig. 3.101) puso de manifiesto que dichos animales presentaban una mayor cantidad de placas que a los 12-13 meses. Se observó además una menor cantidad de placas en los animales inyectados con PBS (Fig. 3.101 A) en comparación con los hemisferios contralateral (Fig. 3.101 B) e ipsilateral (Fig. 3.101 C) de los inyectados con fracciones solubles Braak VI. En la cuantificación estereológica del área inmunomarcada con 6E10, se confirmó que estas diferencias entre los animales inyectados con PBS y con fracciones solubles eran estadísticamente significativas ($n=6-7/\text{grupo}$, $F(2,16)=9,553$, $P=0,0019$) (Fig. 3.102). En el hemisferio contralateral se producía un incremento del $85,45\pm 40,16\%$ en la carga amiloide ($p<0,01$), mientras que en el ipsilateral se daba un incremento del $74,73\pm 33,97\%$ ($p<0,01$) con respecto a los inyectados con PBS. Por otra parte, se analizaron las placas de tipo fibrilar, positivas para Tioflavina-S (Fig. 3.103). Estas placas, mayoritariamente localizadas en el subículo (Fig. 3.103 A1-A3), son más numerosas que a los 12-13 meses de edad. El número de placas totales era significativamente mayor en los

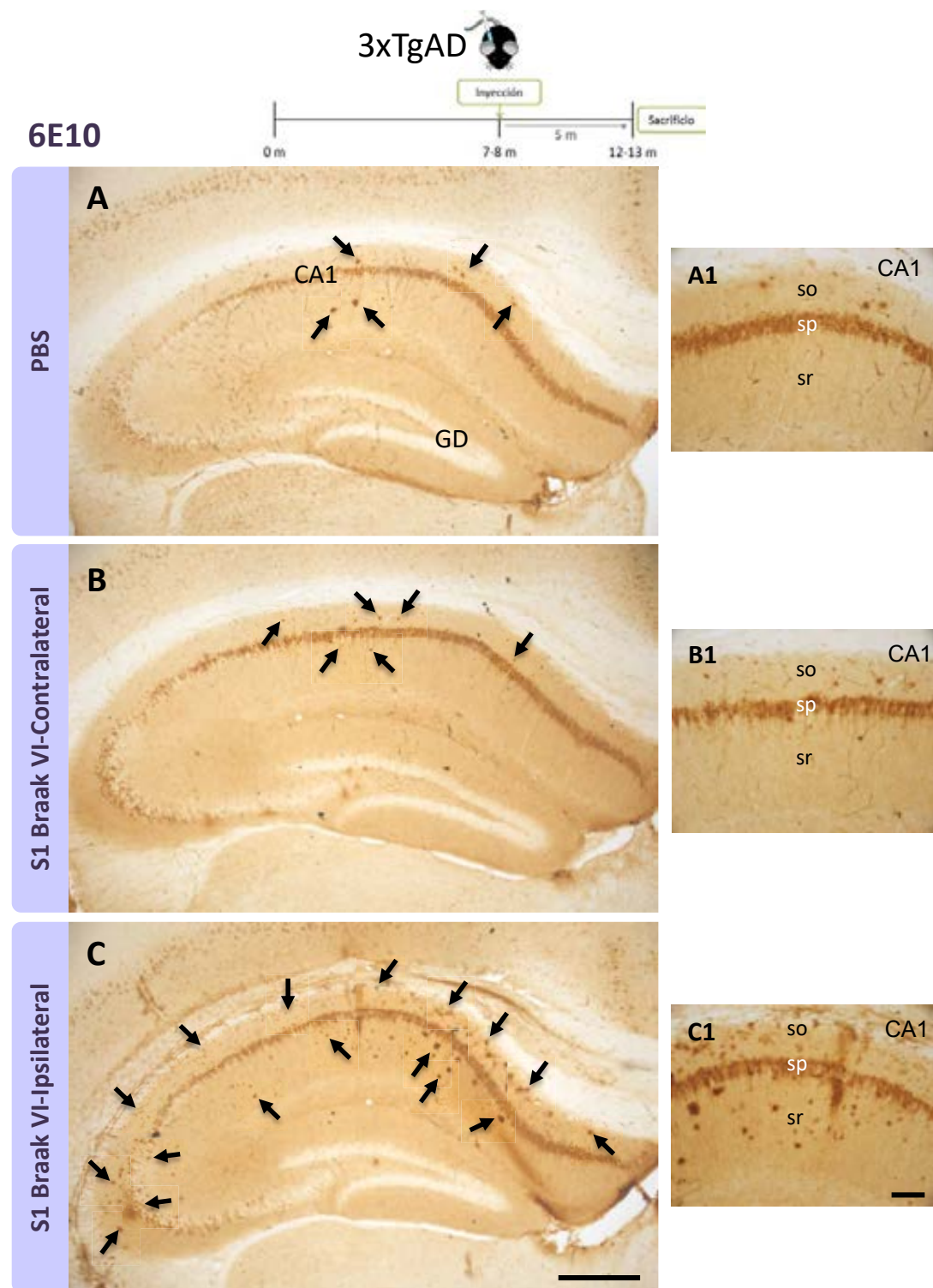


Figura 3.98. Análisis de la patología amiloide en el hipocampo de ratones 3xTgAD inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 5 meses post-inyección (12-13 meses de edad). Mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo 6E10, se detecta la presencia de placas amiloides en todas las condiciones experimentales. Los ratones inyectados con PBS (**A**) apenas presentan depósitos extracelulares, pero sí A β intracelular en las neuronas de la capa piramidal. Los animales inyectados con la fracción soluble de pacientes Braak VI presentan en el hemisferio contralateral (**B**) una menor cantidad de placas que en el hemisferio ipsilateral (**C**). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado; so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*. Barras escala: 400 μ m (A-C) y 100 μ m (A1-C1).

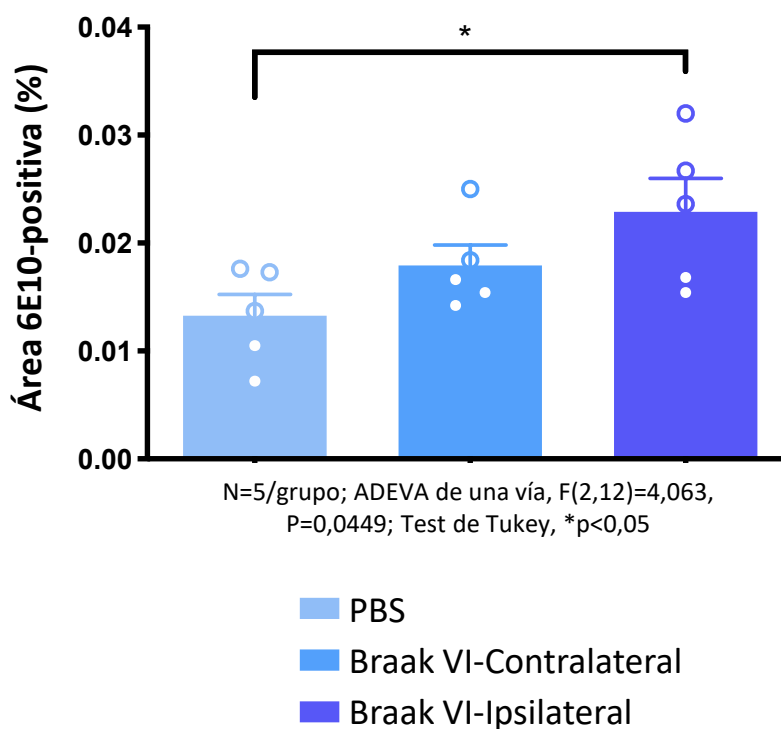


Figura 3.99. Estudio de la carga amiloide en el hipocampo de animales 3xTgAD inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 5 meses post-inyección (12-13 meses de edad). El estudio cuantitativo del área positiva para el marcador 6E10 revela que la acumulación de A β es significativamente mayor en el hemisferio inyectado (ipsilateral) con respecto a los animales inyectados con PBS. No hay diferencias significativas entre el hemisferio contralateral y el ipsilateral. Los datos representados corresponden a las medias \pm SEM. La estadística y significancia se indican en la gráfica.

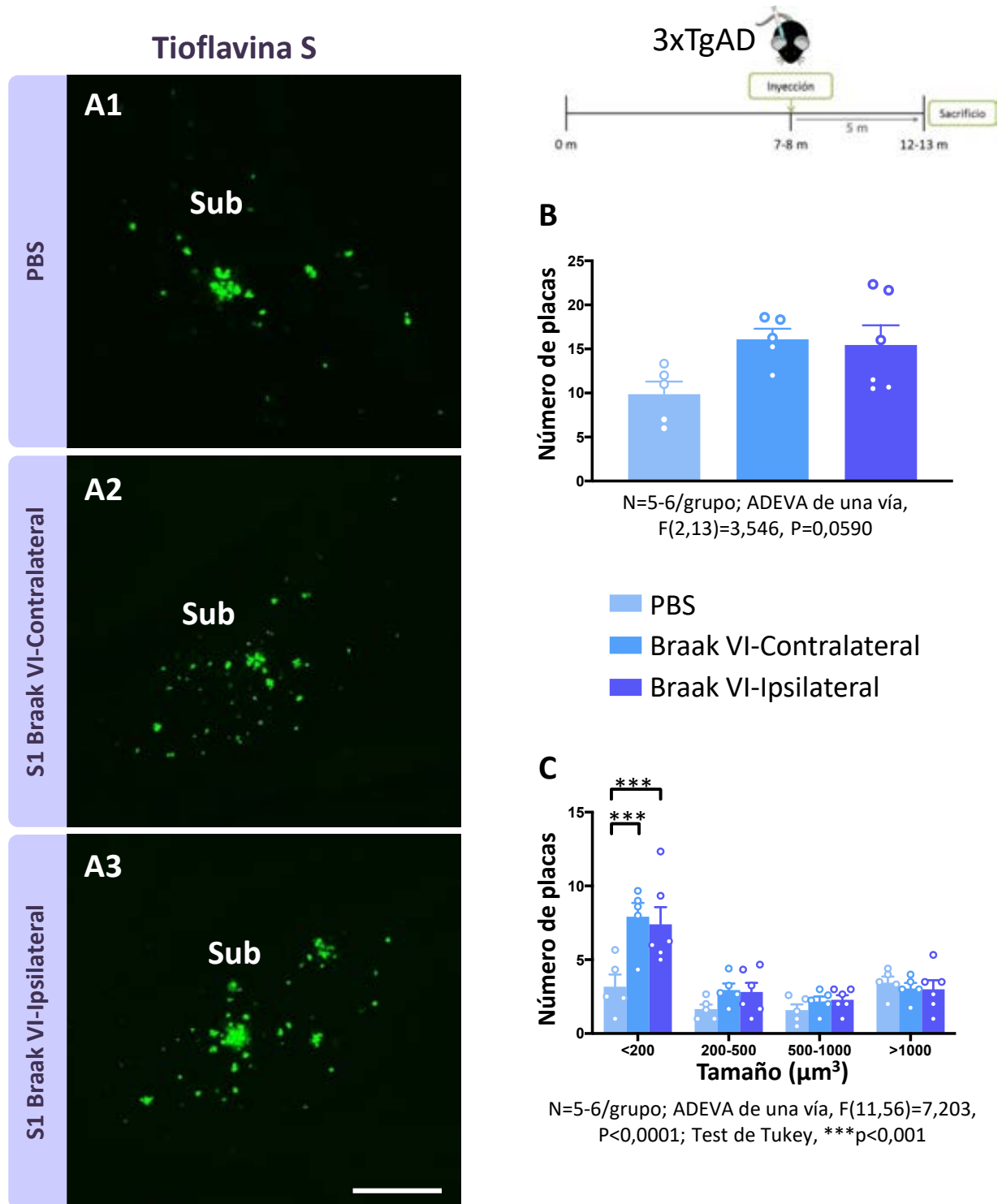


Figura 3.100. Análisis de las placas amiloides fibrilares en el hipocampo de ratones 3xTgAD inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 5 meses post-inyección (12-13 meses de edad). Las placas fibrilares (Tioflavina S-positivas) se encuentran presentes en el subículo principalmente (A), tanto en los animales inyectados con PBS (A1), como en los animales inyectados con la fracción soluble Braak VI (A2-A3). En cuanto al número de placas (B), no se observan diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales. Al clasificar el número de placas por rangos de tamaño (C), se observa una mayor cantidad de placas pequeñas en los animales inyectados con la fracción soluble de pacientes con Alzheimer. Los datos representados corresponden a las medias \pm SEM. La estadística y significancia se indican en las gráficas. Sub: subículo. Barra de escala: 250 μm .

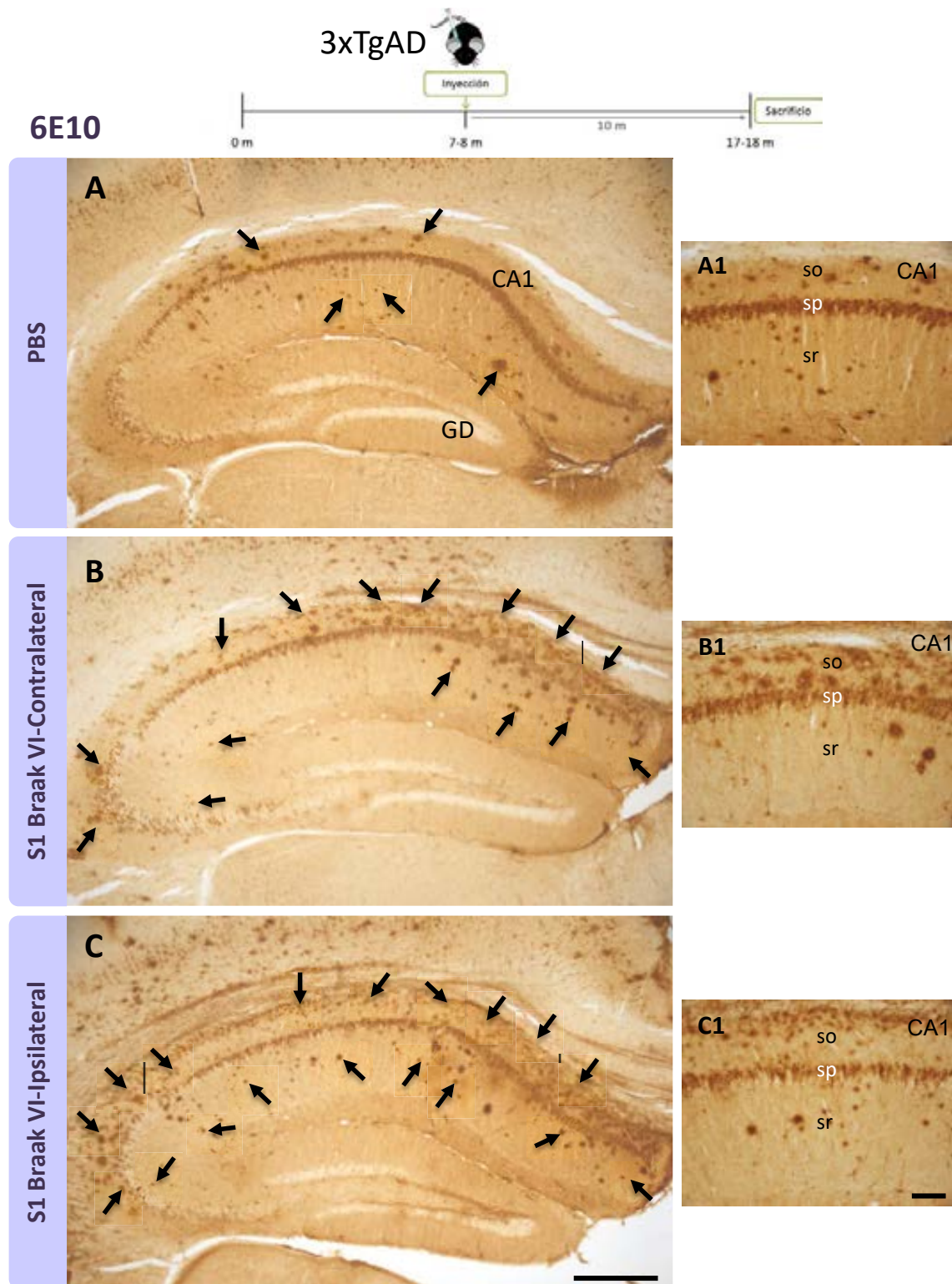


Figura 3.101. Análisis de la patología amiloide en el hipocampo de ratones 3xTgAD inyectados con fracciones solubles Braak VI y con suero a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad). En la inmunohistoquímica con el anticuerpo 6E10 se observa menor cantidad de placas amiloides en los animales inyectados con PBS (A) con respecto a los inyectados con la fracción soluble de pacientes Braak VI (B, contralateral; C, ipsilateral). CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado; so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*. Barras escala: 400 μ m (A-C) y 100 μ m (A1-C1).

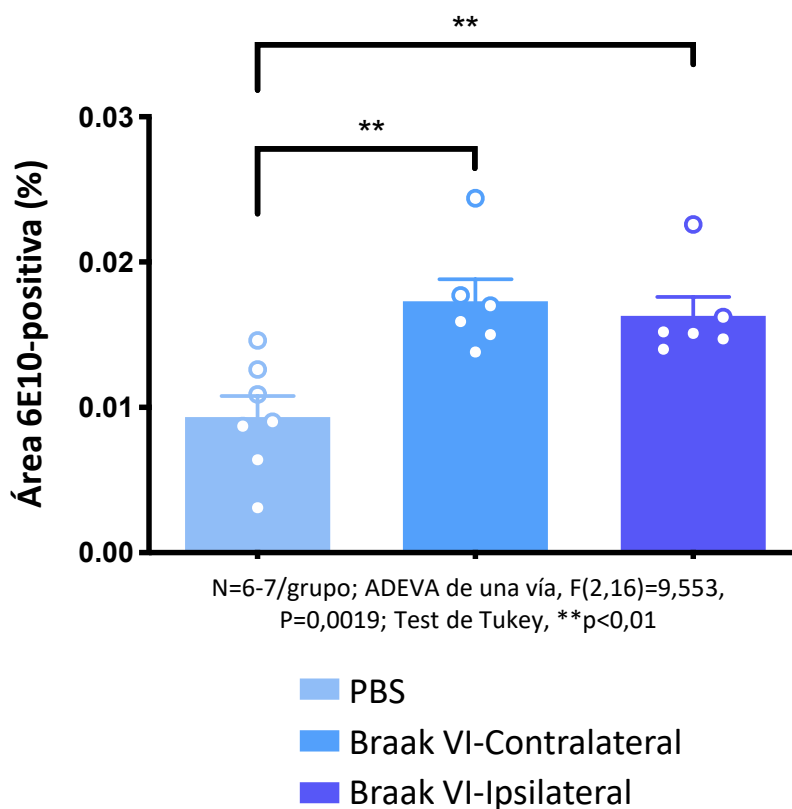


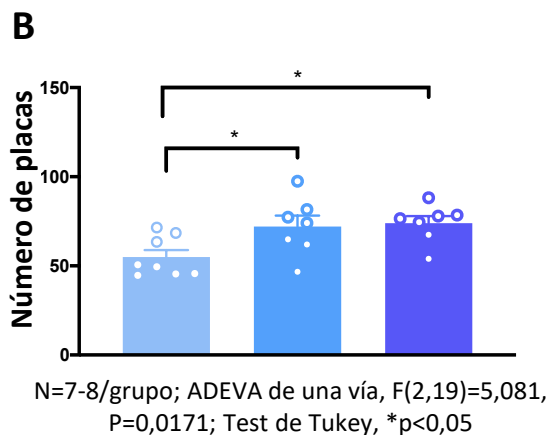
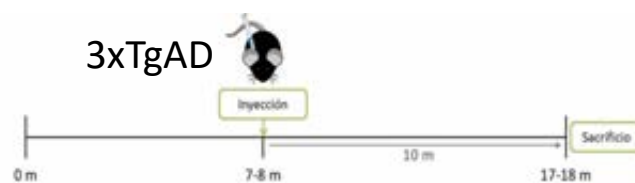
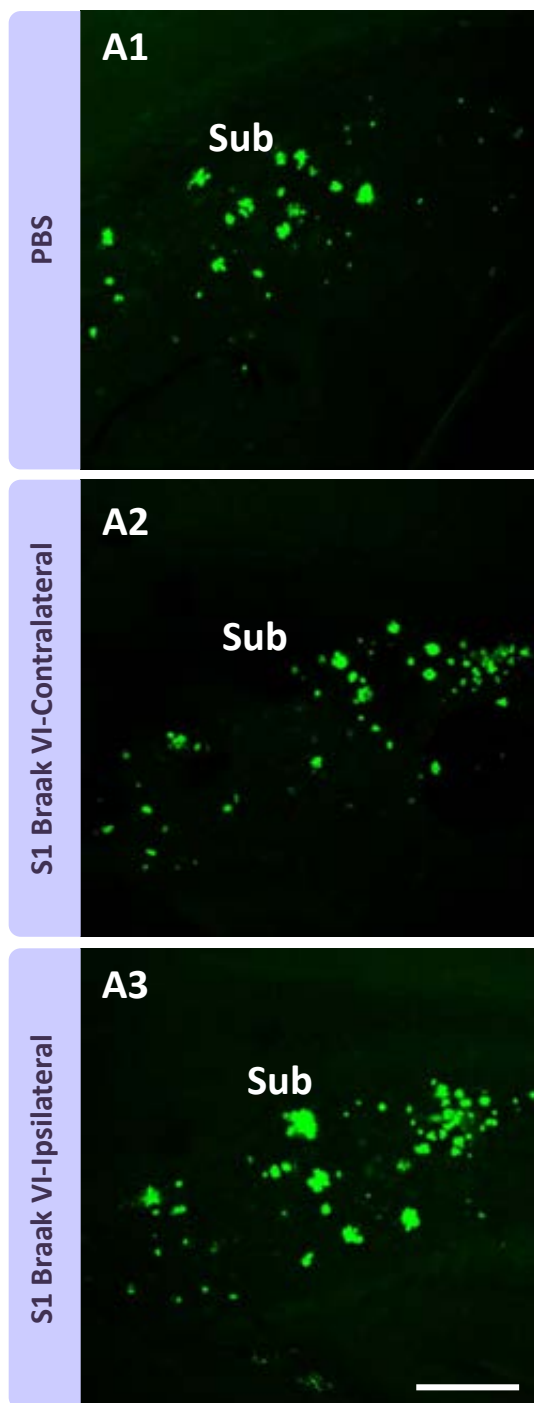
Figura 3.102. Aumento significativo de la carga amiloide en el hipocampo de animales 3xTgAD inyectados con S1 de Braak VI a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad). El estudio cuantitativo de la carga amiloide con el anticuerpo 6E10 revela que la acumulación de A β es significativamente mayor en los animales inyectados con fracción soluble de pacientes Braak VI, tanto en el hemisferio inyectado (ipsilateral) como en el hemisferio contralateral. Los datos representados corresponden a las medias \pm SEM. La estadística y significancia se indican en la gráfica.

animales inyectados con fracciones solubles Braak VI ($n=7-8/\text{grupo}$, $F(2,19)=5,081$, $P=0,0171$) (**Fig. 3.103 B**). El número de placas totales aumentaba un $31,08\pm 29,38\%$ en el hemisferio contralateral ($p<0,05$) y un $34,46\pm 19,49\%$ en el hemisferio ipsilateral ($p<0,05$) respecto a los controles inyectados con PBS. Al clasificar las placas por rangos de tamaño ($<200\mu\text{m}^3$, $200-500\mu\text{m}^3$, $500-1000\mu\text{m}^3$, $>1000\mu\text{m}^3$), se observaron cambios debidos a las inyecciones intracerebrales en las placas de pequeño tamaño y en las de gran tamaño ($n=7-8/\text{grupo}$, $F(11,76)=18,56$, $P<0,0001$) (**Fig. 3.103 C**). Las placas menores de $200\mu\text{m}^3$ fueron más numerosas en los animales inyectados con fracciones solubles en comparación con los controles (contralateral: $1,96\pm 0,57$ veces, $p<0,001$; ipsilateral: $1,54\pm 0,27$ veces, $p<0,05$). La cantidad de placas de gran tamaño (mayores de $1000\mu\text{m}^3$) fue significativamente mayor en el hemisferio ipsilateral en comparación con el contralateral ($1,38\pm 0,27$ veces, $p<0,05$) y con los animales inyectados con PBS ($1,62\pm 0,31$ veces, $p<0,01$).

Los estudios *in vivo* también fueron realizados en el modelo $\text{hA}\beta\text{-KI}$, recientemente desarrollado y caracterizado por el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (**Baglietto-Vargas et al. 2019, Nature Comm.**, en segunda revisión). Este modelo de Alzheimer de tipo esporádico presenta la secuencia del $\text{A}\beta$ humano no mutado en el gen APP endógeno de ratón, presentando una patología amiloide tardía, con placas en el hipocampo a partir de los 18 meses de edad. Parte de los animales $\text{hA}\beta\text{-KI}$ inyectados con fracciones solubles Braak VI y con PBS fueron sacrificados a los 5 meses post-inyección, con 12-13 meses de edad. El marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo 6E10 (**Fig. 3.104**) reveló que estos animales no presentaban placas amiloides extracelulares ni acumulación de $\text{A}\beta$ intraneuronal en las células piramidales de CA1. En cambio, los ratones $\text{hA}\beta\text{-KI}$ que fueron sacrificados a los 10 meses de la operación (17-18 meses de edad) sí presentaban placas positivas para el marcador 6E10 (**Fig. 3.105**). Se observó una mayor cantidad de placas amiloides en el hemisferio ipsilateral de los ratones inyectados con las fracciones solubles Braak VI (**Fig. 3.105 C**). La cuantificación del área positiva para 6E10 mediante técnicas estereológicas (**Fig. 3.106**) reveló que en el hemisferio ipsilateral esta era $3,29\pm 0,93$ veces mayor en comparación con el hemisferio contralateral ($p<0,001$) y $2,88\pm 0,81$ veces mayor respecto a los animales inyectados con PBS ($p<0,001$) ($n=5-6/\text{grupo}$, $F(2,13)=20,79$, $P<0,0001$). Las placas amiloides que se formaron en el hipocampo del modelo $\text{hA}\beta\text{-KI}$ fueron de tipo difuso, siendo por tanto negativas para Tioflavina-S (datos no mostrados).

En su conjunto, estos resultados sugieren que las fracciones solubles S1 de Braak VI inducen un aumento de la patología amiloide tanto en el modelo 3xTgAD como en el $\text{hA}\beta\text{-KI}$, requiriendo este último modelo un mayor tiempo post-inyección para que se estimule la agregación de $\text{A}\beta$ en forma de placas amiloides. En animales WT, como era de esperar, la inoculación no indujo agregación del amiloide endógeno. En el modelo 3xTgAD, las inyecciones causan un incremento de la patología amiloide que comienza en el hemisferio inyectado (ipsilateral) y posteriormente se extiende al hemisferio no inyectado (contralateral). El aumento en el número de placas de tipo fibrilar requiere un mayor tiempo de incubación post-inyección y, en el caso del modelo $\text{hA}\beta\text{-KI}$, estas inyecciones no inducen la formación de placas de tipo fibrilar.

Tioflavina S



■ PBS
 ■ Braak VI-Contralateral
 ■ Braak VI-Ipsilateral

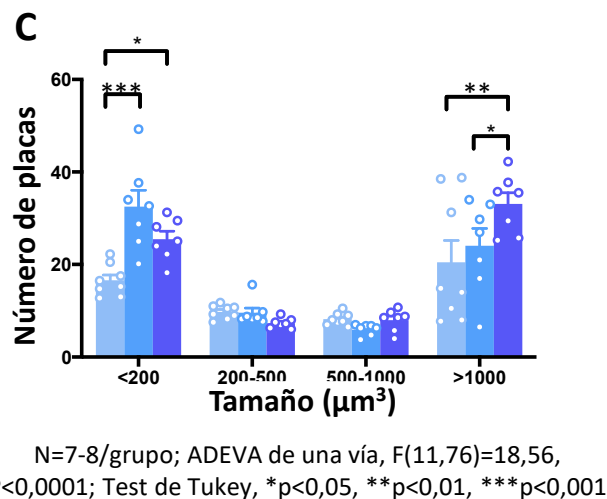


Figura 3.103. Aumento de la patología amiloide fibrilar en el hipocampo de ratones 3xTgAD inyectados con S1 de Braak VI a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad). Las placas fibrilares (Tioflavina-S positivas) se encuentran principalmente en el subículo, tanto en los animales inyectados con PBS (A1), como en los animales inyectados con la fracción soluble Braak VI (A2-A3). El número de placas (B) es mayor en ambos hemisferios (ipsilateral y contralateral) de los animales inyectados con S1 de Braak VI. Al clasificar el número de placas por rangos de tamaño (C), se observa que los animales inyectados con S1 de Braak VI tienen un mayor número de placas pequeñas ($<200\mu\text{m}^3$) y de placas grandes ($>1000\mu\text{m}^3$). Los datos representados corresponden a las medias \pm SEM. La estadística y significancia se indican en las gráficas. Sub: subículo. Barra de escala: $250\mu\text{m}$.

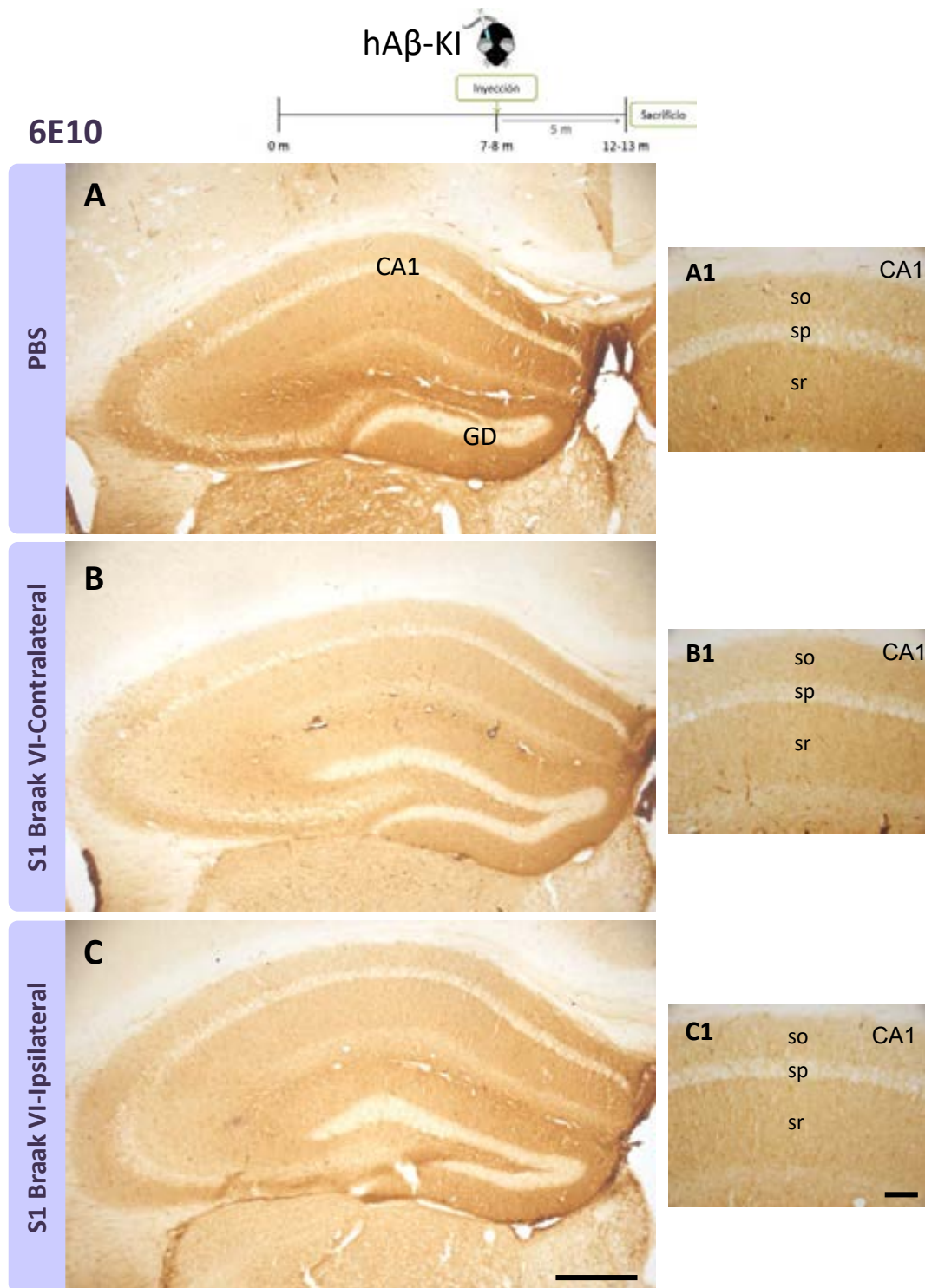


Figura 3.104. La fracción S1 de Braak VI no induce patología amiloide a los 5 meses post-inyección en el hipocampo del modelo hA β -KI. Inmunohistoquímica para 6E10 a los 5 meses post-inyección (12-13 meses de edad). Ni los animales inyectados con PBS (**A**) ni los inyectados con fracciones solubles de Braak VI (**B-C**) presentan depósitos extracelulares de A β . Tampoco se aprecia acumulación intraneuronal de A β en la capa piramidal de CA1. CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*. Barras escala: 400 μ m (A-C) y 100 μ m (A1-C1).

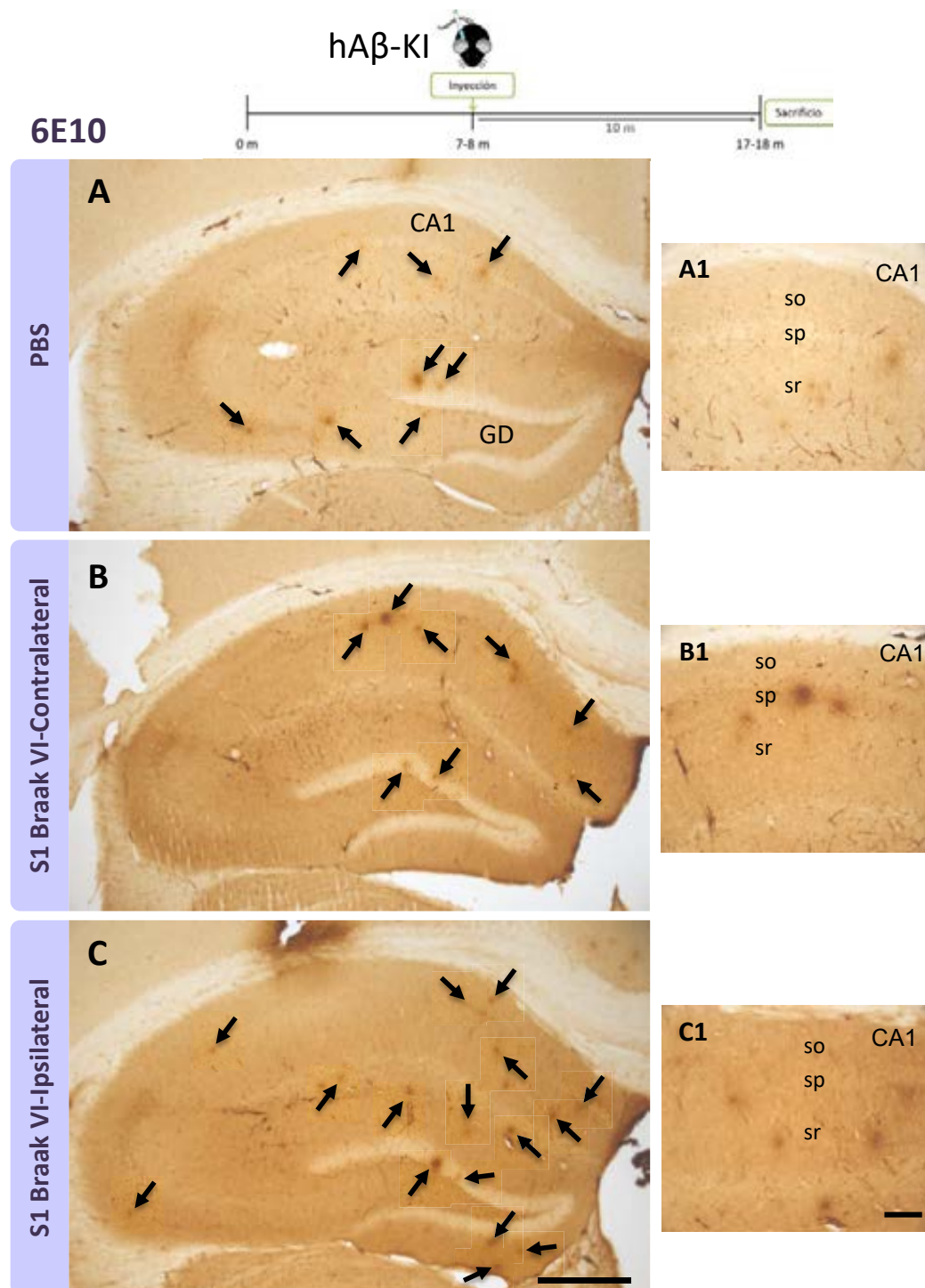


Figura 3.105. La fracción S1 de Braak VI induce patología amiloide en el hipocampo del modelo hAβ-KI a los 10 meses post-inyección. Inmunohistoquímica con 6E10 a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad). A edades avanzadas, los animales presentan depósitos extracelulares de tipo difuso, positivos para el marcador 6E10, tanto en el caso de los inyectados con PBS (**A**), como en los inyectados con fracciones solubles Braak VI (**B-C**). La cantidad de depósitos amiloides es mayor en los animales inyectados con S1 de Braak VI que en los controles inyectados con PBS. CA1: región 1 del asta de Ammon, GD: giro dentado; so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*. Barras escala: 400 μm (A-C) y 100 μm (A1-C1).

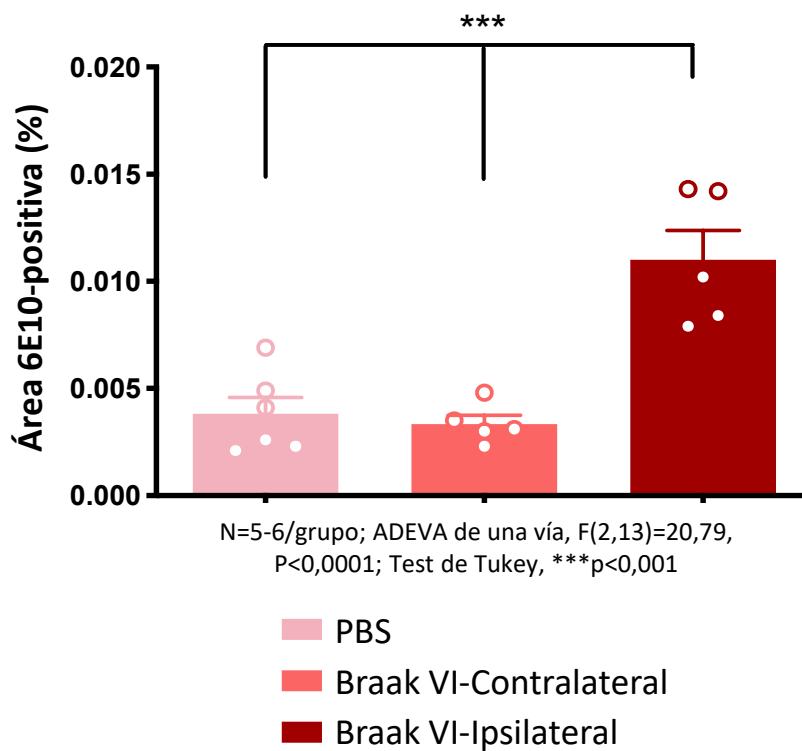
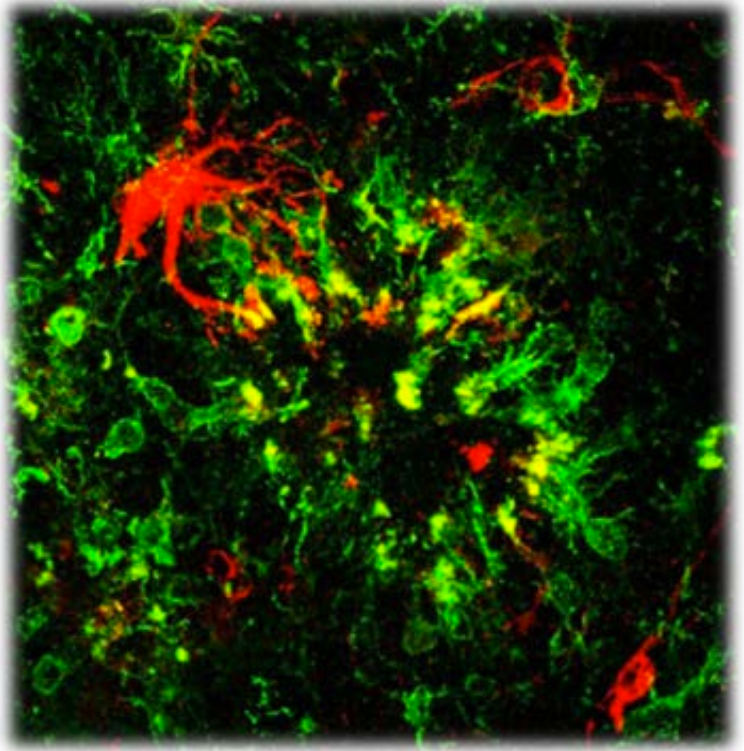


Figura 3.106. Aumento significativo de la carga amiloide en animales hA β -KI inyectados con S1 de Braak VI a los 10 meses post-inyección (17-18 meses de edad). La carga amiloide, analizada mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo 6E10, es significativamente mayor en el hemisferio ipsilateral de los animales inyectados con fracción soluble Braak VI en comparación con el hemisferio contralateral y con los animales inyectados con PBS. Los datos representados corresponden a las medias \pm SEM. La estadística y significancia se indican en la gráfica.

4. Discusión



En el presente trabajo de Tesis doctoral se ha analizado la progresión temporal de la patología amiloide y su relación con la microglía activada en un modelo transgénico amiloidogénico. El principal enfoque ha sido un análisis celular y ultraestructural. La hipótesis de trabajo establecía que la progresión de la patología está asociada a un proceso degenerativo/disfuncional de la microglía a medida que avanza la enfermedad. Esta idea está fundamentada en resultados previos del grupo en muestras humanas *post mortem* de pacientes de Alzheimer (Sanchez-Mejias et al. 2016; Navarro et al. 2018; Gutierrez and Vitorica 2018), donde identificamos la existencia de un proceso degenerativo microglial en la región del hipocampo. La zona del giro dentado era la más afectada en los individuos de fase avanzada (Braak V-VI), con placas neuríticas que presentaban poca o ninguna microglía activada a su alrededor, además la microglía restante mostraba un claro fenotipo morfológico degenerativo. Este escenario de patología microglial en el hipocampo de los pacientes no parece reproducirse en los modelos amiloidogénicos en los que la acumulación extracelular de A β induce una fuerte activación microglial formando una cubierta periplaca. Sin embargo, hasta la fecha no se han analizado con detalle los posibles cambios en la respuesta microglial asociada a la patología amiloide con el avance de la enfermedad en los modelos amiloidogénicos.

El modelo APP/PS1 utilizado en este trabajo ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo y presenta acumulación de depósitos amiloides de forma muy temprana, comenzando en el subículo (2-3 meses de edad, ver Trujillo-Estrada et al., 2014), y extendiéndose rápidamente a las demás regiones hipocampales. La aparición de las placas va acompañada de activación microglial y formación de neuritas distróficas (Jimenez et al. 2008; Sanchez-Varo et al. 2012). Es de destacar que este modelo presenta muerte neuronal en fases tempranas de la enfermedad, con pérdida selectiva de poblaciones GABAérgicas en hipocampo (Ramos et al. 2006; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014), corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez et al. 2009) y corteza perirrinal (Sanchez-Mejias et al. 2019). Las neuronas principales glutamatérgicas del hipocampo son vulnerables en fases más avanzadas de la enfermedad, coincidiendo con un aumento de los niveles de A β oligomérico soluble (Jimenez et al. 2008, 2011). Esta pérdida neuronal va acompañada de una reducida capacidad de neurogénesis hipocampal (Baglietto-Vargas et al. 2017). Además, hemos descrito recientemente que en el modelo ocurre una notable reactividad astrogliar en la cercanía de las placas, identificando una novedosa función de estos astrocitos reactivos, la eliminación fagocítica de presinapsis distróficas (Gomez-Arboledas et al. 2017). En este trabajo nos hemos centrado en la relación entre la microglía activada y la patología amiloide, y los cambios asociados con la progresión de la enfermedad. Además, se ha analizado si la microglía presenta rasgos degenerativos con el avance de la patología. Por último, se ha estudiado el efecto *in vivo* de la inoculación de fracciones solubles (S1) procedentes del cerebro de pacientes de Alzheimer y de modelos amiloidogénicos sobre la patología amiloide. Con todo ello se pretende avanzar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos implicados en la EA, identificar potenciales dianas terapéuticas, y determinar si este modelo transgénico recapitula, al menos en parte, la patología microglial observada en pacientes, lo que aumentaría el valor predictivo del mismo en estudios preclínicos. A continuación, se discuten los resultados más relevantes.

4.1. LAS PLACAS AMILOIDES AUMENTAN EN TAMAÑO Y TOXICIDAD CON LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA EN EL MODELO APP/PS1

En la enfermedad de Alzheimer, A β se acumula extracelularmente, comenzando este proceso hasta 30 años antes de que aparezcan los síntomas, durante la denominada fase asintomática preclínica. Las formas monoméricas se agregan dando lugar a formas oligoméricas solubles altamente tóxicas y formas fibrilares que se depositan en forma de placas amiloides. De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, el A β sería el desencadenante del resto de alteraciones patológicas que ocurren en la enfermedad de Alzheimer: hiperfosforilación de Tau y formación de ovillos neurofibrilares, neuroinflamación, pérdida sináptica y muerte neuronal (Hardy and Higgins 1992; Selkoe and Hardy 2016). A pesar de los numerosos estudios centrados en las placas amiloides, no está claro qué papel ejercen estos depósitos en la progresión de la patología, ni si este es beneficioso o perjudicial. Hasta la fecha ninguna terapia dirigida contra el A β ha tenido éxito, lo que ha puesto en cuestión la validez de la hipótesis de la cascada amiloide (Karran and De Strooper 2016; Makin 2018). Además, no existe correlación clinicopatológica entre la cantidad de placas y el diagnóstico clínico, habiendo individuos cognitivamente normales que pueden acumular gran cantidad de placas amiloides en el cerebro, mientras que en algunos pacientes con demencia hay un escaso desarrollo de placas (Gomez-Isla et al. 2008; Nelson et al. 2012; Perez-Nievas et al. 2013; revisado en Morris et al. 2018). Todo ello ha aumentado la controversia sobre el papel de las placas en esta enfermedad. Por este motivo, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en la caracterización de las placas amiloides y sus propiedades y comprobar si existen cambios durante la progresión de la enfermedad en el modelo amiloidogénico APP/PS1.

En el cerebro de pacientes con Alzheimer se ha descrito la presencia de diversos tipos morfológicos de placas amiloides cuya distribución depende de la región cerebral, las placas difusas, fibrilares y compactas (clásicas) (Serrano-Pozo et al. 2011; DeTure and Dickson 2019). Las placas de tipo clásico o compacto, que se encuentran principalmente en la región CA1 hipocampal, presentan forma redondeada y un núcleo fibrilar compacto rodeado de un halo periférico oligomérico difuso, con neuritas distróficas entre el core fibrilar y el halo. Las placas de tipo fibrilar, que se encuentran preferentemente en el giro dentado, presentan forma estrellada, un core que ocupa prácticamente la totalidad de la placa y un halo oligomérico periférico rodeado por gran cantidad de neuritas distróficas. Además, en el cerebro de pacientes se observa la presencia de placas difusas de gran tamaño, formadas por A β no fibrilar, y que no presentan ni un core ni neuritas distróficas a su alrededor.

En contraposición a la variedad de placas descritas en el cerebro de los pacientes con EA, en los modelos animales se observa una homogeneidad en cuanto al tipo de placas que se forman. En el caso de nuestro modelo APP/PS1, hemos detectado la presencia de dos tipos morfológicos de placas en el hipocampo. Mayoritariamente, se observaron placas fibrilares similares a las que aparecen en el giro dentado de pacientes, sin embargo, también se detectaron placas compactas o clásicas como las que presentan los pacientes en la región CA1. Ambos tipos de placas presentaban neuritas distróficas a su alrededor y generaban una

respuesta microglial, como se discutirá más adelante. En el modelo APP/PS1 no se observaron las placas de tipo difuso que se dan en los pacientes, sin core ni patología neurítica asociada. Aunque se detectaron depósitos sin core fibrilar, estos eran de un tamaño muy pequeño, mucho menor que las placas difusas de humano, y además sí tenían neuritis distróficas asociadas. La ausencia de core en esos depósitos no fibrilares de pequeño tamaño podría deberse a que este aún no se ha formado. La aparición del core fibrilar podría ocurrir a posteriori con el crecimiento de la placa amiloide, ya que no se observaron placas no fibrilares de gran tamaño.

Estos resultados ponen de manifiesto que en el modelo animal también hay variabilidad en cuanto a la tipología de placas amiloides, aunque dicha variabilidad es mucho menor que en el cerebro de pacientes con EA. Los distintos tipos de placas podrían tener diferente origen y toxicidad, y sus propiedades podrían cambiar con la progresión de la patología. La posibilidad de que no todas las placas sean iguales en cuanto a toxicidad, podría explicar la baja correlación que existe entre los síntomas de deterioro cognitivo y la cantidad de placas presentes en el cerebro de los pacientes (Makin 2018). De hecho, se han descrito casos con una alta cantidad tanto de placas amiloides como de ovillos neurofibrilares, pero sin síntomas de demencia. Pese a que estos individuos tenían niveles similares de placas amiloides con respecto a los pacientes con demencia, estos últimos presentaban una mayor cantidad de placas neuríticas con core fibrilar (placas fibrilares y clásicas) y unos mayores niveles de oligómeros solubles de A β (Perez-Nievas et al. 2013; Esparza et al. 2013). Por tanto, las placas de tipo fibrilar/neurítico, ya sean de morfología estrellada o compacta, parecen tener un importante papel tóxico, lo cual justifica la importancia de profundizar en la caracterización de las propiedades de dichas placas.

Una de las regiones que se ven más afectadas por la patología amiloide en nuestro modelo es la formación hipocampal, implicada en los procesos de memoria y aprendizaje. En esta región ocurre una patología amiloide muy temprana, que comienza a los 2 meses en el subículo y a los 3-4 meses en el hipocampo propio, y que va incrementando con la edad (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014). En este trabajo, nos hemos centrado en el estudio de la progresión de la patología amiloide con la edad en CA1 y subículo, realizando un análisis comparativo de la carga amiloide en las dos regiones. Aunque en ambas regiones se producía un claro agravamiento de la patología amiloide con la edad, el subículo se veía afectado antes y mostraba mayor acumulación de placas amiloides que la región CA1. Nuestro grupo ha comprobado que en ambas regiones ocurre pérdida neuronal, que afecta a las interneuronas en fases iniciales, mientras que las neuronas principales se ven afectadas antes en el subículo que en la región CA1 (Ramos et al. 2006; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014). Esta pérdida neuronal podría ser consecuencia de la toxicidad de las placas amiloides, ya que ocurre en paralelo con la deposición extracelular de A β .

La carga amiloide (área hipocampal ocupada por las placas) fue mayor utilizando anti-A β ₄₂ que empleando la tinción de placas fibrilares (Tioflavina-S). La mayoría de las placas del modelo eran de tipo fibrilar con un core positivo para Tioflavina-S, por tanto, las diferencias en la carga amiloide no se deben a que en el modelo existan placas no fibrilares o difusas, sino a que A β ₄₂ está marcando la totalidad de la placa, mientras que la Tioflavina-S marca solo una

parte de la placa, el core fibrilar. Puesto que la mayor parte de placas del modelo APP/PS1 son de naturaleza fibrilar y estas placas parecen tener gran importancia desde un punto de vista patológico, nos centramos en este tipo de depósitos amiloides para el estudio del tamaño de dichas placas y sus cambios con la progresión de la patología. En nuestro modelo, detectamos que con el avance de la enfermedad (análisis de animales desde los 4 a los 18 meses de edad) ocurría una disminución en la proporción de placas pequeñas y un aumento en la cantidad de placas gran tamaño. Estos resultados, obtenidos al estudiar la región CA1, coinciden con los cambios en las proporciones de tamaños de placa en el subículo (Trujillo-Estrada et al. 2014). Esto nos sugiere que las placas que se van formando en nuestro modelo APP/PS1 aumentan en tamaño conforme avanza la patología. Esto difiere con lo observado en la neocorteza temporal pacientes (Serrano-Pozo et al. 2012), ya que los estudios del tamaño de las placas amiloides en dicha región sugieren que el crecimiento de las placas amiloides ocurre a lo largo de la fase preclínica de la enfermedad hasta alcanzar un tamaño estable que se mantiene durante la fase clínica. Estas diferencias entre el modelo APP/PS1 y los pacientes con EA podrían deberse a que en el modelo animal ocurre una patología amiloide mucho más agresiva que en los pacientes, puesto que se trata de un modelo de la forma familiar del Alzheimer. El modelo sobreexpresa el APP mutado y acumula una cantidad de A β mucho mayor que los pacientes. Las diferencias observadas también podrían deberse a que el estudio en pacientes se ha realizado en una región diferente a la estudiada en este trabajo. De hecho, en el hipocampo de pacientes la aparición de placas amiloides ocurre en fases avanzadas de la enfermedad (Sanchez-Mejias et al. 2016).

Como se ha mencionado previamente, las placas fibrilares presentan un core Tioflavina-S positivo rodeado de un halo oligomérico. Esto no solo ocurre en nuestro modelo APP/PS1, sino también en otros modelos amiloidogénicos y en las placas de pacientes con EA (Koffie et al. 2009; Sanchez-Mejias 2015). A nivel ultraestructural, hemos observado que el halo de las placas amiloides muestra inmunorreactividad para A β . Esta marca se localiza asociada a fibras amiloides, pero también la hemos identificado en el espacio extracelular sugiriendo que se trata de oligómeros solubles de A β . Las formas oligoméricas de A β tienen una elevada toxicidad, produciendo una disminución de la función sináptica y del número de sinapsis (Takahashi et al. 2017). Por tanto, el tamaño de ese halo oligomérico que rodea a las placas amiloides podría determinar el nivel de toxicidad de estas. Las placas amiloides podrían suponer una manera de almacenar A β en forma menos tóxica. Las propiedades de las placas podrían cambiar durante la enfermedad, volviéndose más tóxicas y liberando oligómeros hacia el parénquima nervioso. En este sentido, el microambiente alrededor de estas parece ser de gran importancia, ya que los lípidos presentes en el cerebro y que se asocian a las placas amiloides son capaces de desestabilizar y resolubilizar las fibras amiloides *in vitro* dando lugar a protofibrillas (Martins et al. 2008).

Como medida de la toxicidad de las placas amiloides, se analizó el tamaño del halo periférico de las placas para determinar si el tamaño de dicho halo aumentaba con la progresión de la patología en nuestro modelo. Hemos observado que ocurre un aumento en el tamaño del halo con la edad en los animales, pero este se debe al aumento del tamaño de las placas. El tamaño del halo oligomérico aumenta de forma proporcional conforme crece el core de las placas. Debido a que a edades avanzadas hay un mayor número de placas de gran

tamaño y a que el tamaño del core es mayor en estas placas, en animales viejos en su conjunto aumenta la toxicidad asociada a la patología amiloide.

Pese a que las formas oligoméricas solubles de A β son las más tóxicas, las placas amiloides también tienen un efecto tóxico sobre el parénquima nervioso, ya que dan lugar a la formación de distrofias neuríticas a su alrededor. Estas estructuras anómalas se forman como consecuencia de la alteración del citoesqueleto axonal que lleva a fallos en el transporte y a la acumulación de vesículas en el interior de las prolongaciones neuronales (Torres et al. 2012; Sanchez-Varo et al. 2012). Esta neurotoxicidad local que ocurre alrededor de las placas amiloides podría deberse a la liberación de oligómeros solubles por parte de las placas. Como se ha mencionado anteriormente, hemos constatado la presencia de estos oligómeros en el espacio extracelular periplaca mediante inmuno-oro con anti-A β ₄₂, siendo esta la primera evidencia ultraestructural que se describe de oligómeros de A β en este compartimento. En nuestro modelo APP/PS1 todas las placas amiloides presentan neuritas distróficas a su alrededor. Para estudiar si el efecto tóxico de las placas amiloides estaba relacionado con su tamaño, se cuantificó el número de distrofias neuríticas por tamaño de placa en el modelo APP/PS1 desde los 4 (fases iniciales de la patología) a los 12 (fases avanzadas) meses de edad, obteniéndose que cuanto mayor era el tamaño de la placa, mayor era el número de distrofias que la rodeaban independientemente de la edad. Al medir el número de distrofias por perímetro de placa se observó una reducción significativa a los 12 meses con respecto a 4 meses de edad, lo cual podría ser consecuencia del proceso neurodegenerativo (pérdida neuronal) que ocurre en estadios avanzados.

Por tanto, nuestros datos parecen indicar que en este modelo amiloidogénico la toxicidad de las placas amiloides no depende del avance de la patología, sino del tamaño de la propia placa. Las placas de gran tamaño tienen un halo oligomérico más grande y, por tanto, una mayor capacidad de liberar oligómeros solubles hacia el parénquima nervioso, generando una elevada cantidad de distrofias neuríticas a su alrededor. Si comparamos placas de tamaños similares de animales jóvenes y de animales viejos, tendrán una toxicidad similar en cuanto al tamaño del halo y al número de distrofias que las rodean. No obstante, cabe destacar que en los animales de edad avanzada el número de placas de gran tamaño es mucho mayor que en animales jóvenes.

Aunque en nuestro modelo APP/PS1 no vemos un cambio en la toxicidad de las placas amiloides asociado a la progresión de la patología, sino asociado al tamaño de estas, esto podría deberse a que se trata de un modelo de la forma familiar de la enfermedad con una patología amiloide muy agresiva. Esta es una de las grandes limitaciones de la mayoría de los modelos animales actuales, ya que suelen presentar una patología amiloide mucho más marcada que la que muestran los pacientes con EA. Por ello, es de gran importancia desarrollar modelos nuevos que representen la forma esporádica de la enfermedad, como el modelo hA β -KI desarrollado recientemente por el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (Baglietto-Vargas et al., 2019 Nature Comm, en 2ª revisión). En el cerebro de los pacientes, las características tóxicas de las placas amiloides podrían cambiar con la progresión de la enfermedad, puesto que estas están presentes en el cerebro décadas antes de que se inicien los síntomas. En esta fase preclínica de la enfermedad, las placas podrían tener unas características diferentes, con formas agregadas del A β menos tóxicas y/o con una menor liberación de oligómeros al

parénquima, siendo por tanto más inertes y con reducida capacidad de producir daño en las neuronas. Las placas que se desarrollan en los individuos cognitivamente normales podrían tener propiedades similares que expliquen su ausencia de reactividad. ¿Qué ocurre para que las placas pasen de ser inertes a ser reactivas? Es una pregunta aún sin contestación y que merece ser explorada con detalle para poder desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a modular las propiedades de las placas en lugar de bloquear su formación o eliminarlas una vez formadas. Actualmente, en el programa de desarrollo de fármacos contra el Alzheimer (Cummings et al. 2019) hay 132 agentes farmacológicos en ensayos clínicos, de los cuales el 40% tienen como diana terapéutica el A β . De hecho, el amiloide es la diana principal de las terapias en fase 2 y fase 3. Cada vez son más las voces a favor del abandonar el desarrollo de terapias anti-A β (por el continuo fracaso en los ensayos clínicos), y apostar por actuar sobre otros mecanismos patogénicos y por terapias combinadas. No obstante, creemos que, aunque también deben ser exploradas otras vías, no se debe dejar de lado al A β , sino buscar estrategias dirigidas a modular su toxicidad. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento oral con litio en el modelo APP/PS1 produce una reducción de la capacidad tóxica de las placas, generando placas más pequeñas, con menor halo oligomérico y una reducción significativa de las neuritas distróficas (Trujillo-Estrada et al. 2013). Todo ello estuvo acompañado de una mejora cognitiva de los animales. Por tanto, proponemos que la modulación de las propiedades de las placas es una diana que debe ser considerada en futuras terapias para el Alzheimer.

4.2 RELACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE CON LA MICROGLÍA ACTIVADA. CAMBIOS CON LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

La respuesta inflamatoria, mediada por la activación de la microglía y de la astrogliá, es una característica común de las enfermedades neurodegenerativas, y entre ellas, la enfermedad de Alzheimer. La presencia de microglía activada y astrocitos reactivos alrededor de las placas neuríticas es una de las manifestaciones patológicas de la EA (Itagaki et al. 1989; Serrano-Pozo et al. 2013). En los últimos años, se han identificado mediante estudios de GWAS diversos genes microgliales implicados en un mayor riesgo de padecer Alzheimer esporádico, entre los que se encuentran *TREM2*, *APOE*, *LGALS3*, *CLU*, *PICALM*, *CD33* y *ABCA7* (Guerreiro et al. 2013; Hansen et al. 2018; Guimas Almeida et al. 2018; Pimenova et al. 2018; Boza-Serrano et al. 2019). Estos hallazgos han otorgado a la microglía un papel clave en la patogénesis de la enfermedad y la han situado en el punto de mira de la investigación actual. Pese a los numerosos estudios encaminados a dilucidar el papel de la microglía en la enfermedad de Alzheimer, aún no está claro si estas células inmunes residentes del SNC tienen una función beneficiosa o perjudicial en el desarrollo y progresión de la patología, si existen diferentes subpoblaciones de microglía activada, si estas muestran un fenotipo funcional diferente dependiendo de la región y el estadio de la enfermedad, y más importante, si sufren un proceso degenerativo/disfuncional con el tiempo. En esta Tesis Doctoral hemos tratado de profundizar en el análisis molecular, celular y subcelular de esta población glial para aportar nuevos avances en la relación de la microglía activada con la patología amiloide, determinar

posibles cambios con la evolución de la patología, así como si manifiesta cambios morfológicos degenerativos a medida que avanza la enfermedad. Para ello, hemos empleado el modelo APP/PS1, caracterizado por presentar una marcada respuesta inflamatoria astrogial (Gomez-Arboledas et al. 2017) y microglial (Jimenez et al. 2008).

4.2.1. EL PROCESO DE ACTIVACIÓN MICROGLIAL SE SATURA EN FASES AVANZADAS DE LA ENFERMEDAD A PESAR DEL CONTINUO AUMENTO DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE

La microglía homeostática (no activada) se caracteriza morfológicamente por presentar prolongaciones finas y muy ramificadas, y un cuerpo celular pequeño. La activación microglial ocurre cuando se produce un estímulo perjudicial, como la presencia de lesiones tisulares, muerte celular o entrada de agentes patógenos. Esto lleva a cambios en la expresión de genes que se traducen en cambios morfológicos, como el acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones así como el aumento en tamaño del cuerpo celular (Li and Barres 2018). En el modelo APP/PS1 ocurre una fuerte activación microglial alrededor de las placas amiloides, que difiere de lo observado en el hipocampo de pacientes con EA (Braak V-VI), que presentan una activación microglial moderada (Sanchez-Mejias et al. 2016). Hay que tener en cuenta que la carga amiloide del hipocampo de los pacientes es mucho menor que la que tiene lugar en el modelo APP/PS1 (Jimenez et al. 2008). Esto supone una limitación a la hora de usar el modelo animal para el estudio de la respuesta microglial. No obstante, tanto en el hipocampo de APP/PS1 como en el de los pacientes de EA, las placas son de tipo fibrilar/compacto y por tanto son placas neuríticas. Esto nos permite emplear este modelo animal para el estudio de la relación entre la microglía y las placas amiloides.

La microglía activada en el hipocampo de nuestro modelo APP/PS1 se asocia específicamente con las placas amiloides, no hallándose en las regiones interplaca hasta edades muy avanzadas, cuando los niveles de A β oligomérico soluble son altos, provocando la activación de esta microglía alejada de placa (Jimenez et al. 2008). En este trabajo nos hemos centrado exclusivamente en la microglía periplaca. Esta microglía presenta morfología activada con prolongaciones cortas y engrosadas, y un cuerpo celular hipertrófico. Además, expresa los marcadores de activación como CD45 (antígeno de superficie celular), CD68 (proteína lisosomal) y TREM2 (receptor expresado en células mieloides). Por el contrario, la microglía interplaca homeostática (más abundante en las fases iniciales de la enfermedad) no expresa marcadores de activación y expresa los marcadores homeostáticos CX3CR1 (receptor de fractalquina), P2RY12 (receptor purinérgico) y TMEM119 (proteína transmembrana 119) (revisado en Holtman et al. 2017; Sarlus and Heneka 2017), y a nivel morfológico presenta un cuerpo celular pequeño con numerosas prolongaciones muy ramificadas. Ambos tipos de microglía, activada y homeostática, expresan el marcador Iba1. Nuestros resultados demuestran que existe una alta correlación positiva entre la patología amiloide (carga amiloide) y la microglía activada marcada con anti-CD45 o con anti-TREM2, ya que aumentan en paralelo con la edad. Por tanto, existe una estrecha relación entre ambos procesos, formación/desarrollo de las placas amiloides y activación microglial. La relación funcional entre ambos procesos la discutiremos más adelante. Es de destacar que el proceso de activación microglial en el hipocampo del modelo APP/PS1 es progresivo y pronunciado hasta los 12

meses de edad; sin embargo, hemos podido confirmar con dos de los marcadores de activación (CD45 y TREM2) que a partir de esta edad y hasta los 18 meses (edad máxima de nuestro estudio) la respuesta microglial parece sufrir un freno, o proceso de saturación, a pesar de que sigue aumentado significativamente la carga amiloide. Esta saturación de la respuesta microglial con la patología amiloide en ratones APP/PS1 viejos está en consonancia con el reciente estudio longitudinal *in vivo* realizado en un modelo APP mediante PET, usando el radioligando F18-GE180 para TSPO (18KDa *tranlocator protein*, un marcador microglial) y 18F-florbetaben (radioligando para A β), donde observan saturación de la respuesta microglial mientras sigue aumentado la amiloidosis (Blume et al. 2018). Esto podría estar indicando, por un lado que la microglía es incapaz de mantener un estado activado como consecuencia del largo y crónico periodo de activación al que se ha visto sometida, y/o que hay una disminución en la proliferación (renovación) microglial con la edad.

En este sentido, la microglía es una población celular muy longeva en situación fisiológica pudiendo persistir durante toda la vida (Füger et al. 2017). En situación patológica, como la enfermedad de Alzheimer, tiene lugar un aumento de la proliferación microglial, y la nueva microglía deriva de la división de células microgliales maduras y no de células precursoras (Füger et al. 2017; revisado en Askew and Gomez-Nicola 2018). En nuestro modelo se ha confirmado este aumento proliferativo de la microglía a edades tempranas (Baglietto-Vargas et al. 2017). Sin embargo, desconocemos si a los 18 meses de edad tiene lugar una disminución de la proliferación microglial en nuestro modelo. Para contestar a esta pregunta, hemos inyectado BrdU en animales APP jóvenes y viejos y estamos realizando dobles marcajes con Iba1 para analizar cuantitativamente los datos. En un estudio reciente en ratones viejos a los que se le eliminó la microglía mediante tratamiento con un inhibidor de CSFR1 (*colony-stimulating factor 1 receptor*, factor crucial para la supervivencia microglial) y posteriormente tras la retirada del tratamiento se volvió a repoblar de nueva microglía, se observó que la nueva microglía tenía características de microglía “joven” no activada en contraposición a la microglía “vieja” o senescente (Elmore et al. 2018). Lo más interesante de este estudio es que la renovación de la microglía produjo un aumento de la neurogénesis, de la densidad de espinas dendríticas, y además rescató los déficits asociados con la edad en la LTP. Estos estudios apoyan la idea de que la microglía con la edad sufre un proceso de senescencia con pérdida de función “normal” y/o ganancia de función “tóxica”, y por tanto la renovación/rejuvenecimiento de la población microglial podría ser una interesante y novedosa terapia. En este sentido, se ha comprobado *in vitro* la capacidad de restaurar la función microglial en un contexto de Alzheimer mediante co-cultivos de secciones de cerebro de ratón APP/PS1 viejo con secciones de cerebro de ratón joven sano, o bien con los medios condicionados (Daria et al. 2016). En estas situaciones la microglía envejecida patológica recupera la capacidad de eliminar el A β y reduce el tamaño de las placas amiloides. Por tanto, factores presentes en los individuos jóvenes inducen la recuperación de la microglía envejecida.

Teniendo en cuenta que la enfermedad de Alzheimer afecta a las personas mayores de 65 años, el impacto sobre la microglía es doble, por un lado el efecto propio del envejecimiento y por otro el proceso patológico al que se ven expuestas. Las células microgliales en la EA han sido descritas como células agotadas funcionalmente, senescentes o

degenerativas (Streit et al. 2014), por lo que la idea de restaurar la función microglial o bien renovar la población debería ser considerada a nivel terapéutico.

Otra cuestión abierta a la discusión concierne a la relación entre la población microglial residente y las células mieloides periféricas, así como su impacto en la patología amiloide. Existe la posibilidad de infiltración de estas células periféricas hacia el parénquima cerebral como consecuencia de una alteración en la barrera hematoencefálica en los pacientes de Alzheimer. De hecho la mayoría de los pacientes sufren de angiopatía amiloide cerebral (AAC), enfermedad asociada al depósito de A β en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales y leptomeníneos (Hecht et al. 2018). Además, es conocido el aumento de expresión de quimioquinas que tienden a promover la infiltración de células mieloides, como CCL2 (Galimberti et al. 2006; Sokolova et al. 2009). Estas células mieloides podrían ser atraídas hacia las placas amiloides e influir en el desarrollo de la patología. Las células mieloides no parenquimales asociadas al SNC (macrófagos perivascuales, macrófagos de los plexos coroideos y macrófagos meníneos; en las meninges además hay monocitos, células dendríticas y granulocitos; revisado en Herz et al. 2017), los monocitos circulantes y la microglía comparten la expresión de una amplia batería de genes, lo que dificulta enormemente su identificación (Kierdorf et al. 2019). Además, tras la infiltración podrían adquirir un fenotipo morfológico y molecular similar al de la microglía haciendo aún más difícil su distinción. En pacientes, no existe una evidencia clara de la entrada de monocitos periféricos (Prinz and Priller 2017). En este sentido nuestro grupo en colaboración con el Dr. Vitorica está intentado dar respuesta a esta cuestión. En cuanto a los modelos amiloidogénicos, varios trabajos recientes demuestran la ausencia de infiltración de macrófagos periféricos hacia el parénquima cerebral (Wang et al. 2016; Shukla et al. 2019). En nuestro modelo APP/PS1 tampoco hemos visto evidencias de la entrada de macrófagos, aunque sí existe infiltración de linfocitos en fases avanzadas de la enfermedad (Jimenez et al. 2008). De hecho, se ha propuesto que en ausencia de modificaciones patológicas en el nicho microglial, las células mieloides circulantes (los monocitos) no colonizan el parénquima cerebral (Cronk et al. 2018). Sin embargo, en pacientes de EA este nicho microglial podría estar afectado por la patología. En consecuencia, conocer si existe infiltración de células mieloides periféricas y qué papel desempeñan en la progresión de la EA es aún una asignatura pendiente y podría diferir entre los modelos animales y los pacientes.

4.2.2. LA MICROGLÍA ACTIVADA SE CARACTERIZA POR LA EXPRESIÓN DE LA FIRMA MOLECULAR “DAM”

Respecto a la activación microglial, tradicionalmente se ha considerado que la microglía reactiva podía presentar un fenotipo proinflamatorio (clásico, M1) o un fenotipo antiinflamatorio (alternativo, M2) (Colonna and Butovsky 2017). No obstante, esta clasificación de la microglía activada está en desuso, puesto que se ha visto que la microglía exhibe un espectro de activación dinámico en lugar de tener dos estados de activación diferenciados M1 y M2. Estudios recientes han identificado en modelos animales la existencia de un perfil transcriptómico común a diversas enfermedades neurodegenerativas, denominado perfil DAM (microglía asociada a enfermedad; también denominado fenotipo microglial neurodegenerativo o MGnD). Este perfil se caracteriza por la sobreexpresión de genes

relacionados con la activación así como la disminución en la expresión de genes homeostáticos (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017). En esta Tesis Doctoral se realizó un análisis transcriptómico (resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica) de la microglía activada de animales APP jóvenes (3 meses) y viejos (12 meses) en la corteza y el hipocampo. Se observó que, con la edad, no solo ocurría un aumento en la cantidad de células microgliales activadas, sino que también se producía un cambio en la expresión de genes microgliales. Ocurría un incremento en la expresión de genes DAM (*CLEC7A*, *IGF1*, *CST7*, *AXL*, *SPP1*, *CD68*, *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP*, *APOE*), mientras que disminuía la expresión de genes homeostáticos microgliales (*CSF1R*, *CX3CR1*, *P2RY12*, *TMEM119*). Estos cambios en la expresión génica están relacionados con la patología amiloide, puesto que a los 3 meses el modelo APP no presenta placas, o muy pocas, mientras que a 12 meses la patología amiloide es extensa y desencadenaría este aumento de expresión de los genes DAM microgliales. Algunos de estos genes DAM que se sobreexpresan en la microglía activada de animales viejos son además factores de riesgo descritos para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, como *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP* y *APOE*. Esto es una evidencia inequívoca de que la microglía está implicada en la patogénesis de la EA.

En la adquisición del fenotipo DAM de la microglía, el receptor *TREM2* (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) juega un papel importante, no obstante, no es el único factor implicado, puesto que en ausencia de *TREM2* se produce un estado de activación parcial de la microglía en respuesta a A β (Song and Colonna 2018). *TREM2* se expresa en la microglía homeostática, pero su expresión se ve aumentada en la microglía DAM. Aún no está claro cómo ocurre la activación DAM, pero se cree que ocurre en dos pasos. En la etapa DAM 1, que es independiente de *TREM2*, ocurre una bajada en los niveles de expresión de genes microgliales homeostáticos, como *CX3CR1*, *P2RY12*, *TMEM119*, y una sobreexpresión de genes de activación, como *TYROBP* y *APOE*. En la etapa DAM 2, dependiente de *TREM2*, se produce la sobreexpresión del propio *TREM2* y otros genes como *AXL*, *CST7* y *CLEC7A*. Como consecuencia de estos cambios en la expresión génica, ocurren una serie de cambios morfológicos y un aumento de la fagocitosis (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017). Más aún, *APOE*, el factor de riesgo más importante para el Alzheimer esporádico, también está implicado en la adquisición del fenotipo DAM, siendo la vía *TREM2-APOE* un regulador clave de este fenotipo microglial (Krasemann et al. 2017). No obstante, aún quedan muchas incógnitas respecto a cómo ocurre la activación DAM, por lo que es necesario seguir profundizando en este aspecto, ya que esta microglía activada es de gran importancia en la enfermedad de Alzheimer, así como en otras enfermedades neurodegenerativas.

Como se ha mencionado, *TREM2* interviene en la activación DAM de la microglía, aunque su papel aún no está claro. Este receptor de membrana se expresa en las células mieloides, se activa al interactuar con la proteína adaptadora *DAP12* (*TYROBP*) y desencadena una cascada de señalización que produce cambios en la expresión génica (Ulland and Colonna 2018). Además, se trata de un factor de riesgo para el desarrollo de Alzheimer esporádico, puesto que la mutación de pérdida de función *R47H* hace que se incremente el riesgo de desarrollar EA (Guerreiro et al. 2013). Esto parece indicar que *TREM2* y, por tanto, la activación DAM de la microglía tendrían una función beneficiosa en la enfermedad de Alzheimer. En este sentido, *TREM2* se ha relacionado con la supervivencia y la preservación del

metabolismo microglial frente a un ambiente tóxico (Song and Colonna 2018). Sin embargo, en modelos animales amiloidogénicos, los experimentos relacionados con la deficiencia de TREM2 han revelado resultados contradictorios, observándose tanto una disminución como un agravamiento de la patología amiloide cuando se elimina el gen *TREM2*. Esto podría deberse a que el efecto de la falta de TREM2 podría variar dependiendo del estadio de la enfermedad. En este sentido, Jay et al. (2016) han observado que la deficiencia de TREM2 mejoraría la patología amiloide en fases tempranas pero la empeoraría en estadios avanzados de la enfermedad.

Otro de los genes que se sobreexpresan en la microglía DAM es APOE, el principal factor de riesgo de Alzheimer esporádico. Concretamente, la variante *APOEε4* aumenta hasta cuatro veces el riesgo de sufrir Alzheimer, mientras que la variante *APOEε2* reduce el riesgo de padecer la enfermedad (Verghese et al. 2011). APOE se expresa principalmente en los astrocitos y, en menor medida, en la microglía DAM. Junto con TREM2 parece tener una importante función en la activación DAM, ya que la deficiencia de APOE resulta en una reducción del perfil DAM microglial, aunque esta es menos pronunciada que cuando hay deficiencia de TREM2 (Song and Colonna 2018).

Una cuestión importante es conocer si el fenotipo DAM identificado en modelos amiloidogénicos (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017; revisado en Deczkowska et al. 2018) tiene un equivalente en el cerebro de pacientes de Alzheimer. A este respecto, un estudio reciente mediante análisis transcriptómico de células individuales a partir de la corteza frontal de muestras *post mortem* de individuos con EA (Mathys et al. 2019) ha identificado una firma molecular microglial algo diferente a la descrita en modelos animales. De los 229 genes que se sobreexpresan en la microglía DAM de modelos amiloidogénicos, se han encontrado solamente 28 en la firma humana, incluyendo *APOE*, *SPP1* y *CD74*. Curiosamente, los genes microgliales sobreexpresados en modelos e individuos con EA se solapan con la firma molecular identificada en la microglía en el cerebro envejecido (Olah et al. 2018). A esta firma microglial humana en lugar de DAM se la ha comenzado a denominar HAM (*Human Alzheimer's Microglia*) (Srinivasan et al. 2019). Es tentador especular que la firma microglial en los pacientes de EA refleja un estado disfuncional, y que la disfunción microglial asociada a la edad podría ser el motor conductor de la patología.

Otros genes cuya expresión se ve aumentada en la microglía activada del modelo APP son *CD68* y *LGALS3*. En apartados siguientes se discutirá sobre la función de estos genes microgliales y su relación con la enfermedad de Alzheimer.

4.2.3. LA MICROGLÍA PERIPLACA EXHIBE DIFERENTES FENOTIPOS FUNCIONALES NEUROPROTECTORES: SUBTIPOS MICROGLIALES Y CAMBIOS ASOCIADOS A LA PATOLOGÍA

La relación funcional entre la microglía activada y la patología amiloide no ha sido bien definida aún. A la microglía que rodea a las placas se le han atribuido diversas funciones, tanto beneficiosas como perjudiciales (Sarlus and Heneka 2017; Hansen et al. 2018; McQuade and Blurton-Jones 2019). Entre las funciones potencialmente beneficiosas, se incluyen la fagocitosis de Aβ, la envoltura/aislamiento de las placas y la fibrilación/compactación del Aβ.

Por otra parte, la microglía activada también podría tener efectos negativos en la progresión de la patología, ya que la liberación de moléculas proinflamatorias (TNF α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL6, IL-12) causaría daño neuronal. Es posible que existan diferentes subtipos funcionales dentro de la microglía, tanto en situación homeostática como patológica, que pueden diferir según la región cerebral, los estímulos a los que estén sometidas, el contexto patológico y la fase de la enfermedad (Stratoulis et al. 2019). En este trabajo hemos analizado a nivel celular y ultraestructural la microglía periplaca para avanzar en el conocimiento de su interacción funcional con la patología amiloide. Un mejor conocimiento de los potenciales subtipos funcionales de microglía activada es fundamental para el desarrollo de futuras terapias dirigidas a la modulación microglial.

Microglía periplaca con fenotipo fagocítico

Una de las funciones clásicas asignadas a la microglía activada que rodea a las placas amiloides es la fagocitosis y eliminación del A β . De hecho, muchos de los genes de riesgo para el Alzheimer altamente expresados por la microglía afectan a la fagocitosis de A β . En la recién descrita microglía DAM asociada a las placas amiloides, se ha observado un incremento del metabolismo lipídico, de la actividad lisosomal y de la fagocitosis. En esta microglía DAM, la activación de TREM2 promueve la fagocitosis y mantiene el estado fagocítico de la célula. Además, inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias. APOE, otra de las proteínas cuya expresión aumenta en la microglía DAM, interacciona con el A β y con TREM2, facilitando la fagocitosis de A β en la microglía (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017; Hansen et al. 2018; Henstridge et al. 2019). Estas evidencias apoyan por tanto la idea clásica de que la microglía alrededor de las placas amiloides es fagocítica y trata de eliminar el A β .

En relación con el papel fagocítico de la microglía en la EA, nuestro análisis transcriptómico revela que *CD68* aumenta su expresión en la microglía activada con la progresión de la patología. *CD68*, cuya expresión ocurre principalmente en las membranas de los lisosomas/endosomas, es un receptor de tipo *scavenger* que se une a lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. Este marcador relacionado con la fagocitosis, no solo se expresa en la microglía, sino también en linfocitos y macrófagos (Hendrickx et al. 2017). Con el fin de comprobar si este aumento en la expresión de *CD68* estaba relacionado con una alta actividad fagocítica de la microglía alrededor de las placas amiloides, se realizó un estudio inmunohistoquímico en el modelo APP/PS1, observándose que la microglía periplaca presentaba una alta expresión del marcador *CD68*. También se detectó una elevada inmunorreactividad para *LAMP1*, marcador presente en los lisosomas/endosomas de una gran variedad de tipos celulares, entre los que se encuentran las neuronas, los astrocitos y la microglía. Hemos constatado la presencia de tinción para Tioflavina-S (fibras amiloides) y marca inmunorreactiva para A β en el interior de la microglía y, en ocasiones, este marcaje colocalizaba con el marcador lisosomal *LAMP1*, indicando por consiguiente que la microglía de nuestro modelo participa activamente en la fagocitosis y degradación de A β . También hemos demostrado mediante evidencias ultraestructurales la actividad fagocítica de la microglía periplaca. Numerosas células microgliales alrededor de las placas amiloides presentaban fagolisosomas en su interior con un contenido muy electrodensito y aspecto fibrilar, indicando que podría tratarse de fibras amiloides. Aunque a microscopía electrónica el contenido de estos fagolisosomas no presentaba marca positiva utilizando inmuno-oro para anti-A β , esto

podría deberse al proceso de degradación lisosomal, que podría desnaturalizar el epítipo reconocido por el anticuerpo. La presencia de fibras amiloides en el interior de lisosomas microgliales ha sido descrita también por otros autores en modelos animales amiloidogénicos (5xFAD y 3xTgAD) y en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer (Spangenberg et al. 2019).

La elevada cantidad de cuerpos fagocíticos de gran tamaño que se observa en la microglía periplaca a nivel ultraestructural podría indicar que la microglía una vez que fagocita las fibras amiloides no es capaz de degradarlas correctamente. De hecho, la acumulación de estos fagolisosomas y su aumento en tamaño podría inducir degeneración en la microglía. La acidificación de los lisosomas es requerida para una rápida y completa degradación de las proteínas y desechos celulares por parte de la microglía. La activación induce la acidificación de los lisosomas (Majumdar et al. 2007), pero si la microglía no puede activarse adecuadamente la eficiencia lisosomal estaría disminuida. Es posible que la activación crónica microglial produzca un deterioro del proceso de acidificación lisosomal, con la consecuente reducción del proceso de degradación intracelular por parte de estas células y adquisición de un fenotipo disfuncional. En este sentido, hemos identificado a microscopía electrónica de transmisión que en nuestro modelo hay un tipo de microglía asociada a las placas amiloides que presenta un citoplasma con electrodensidad muy elevada. Este subtipo ultraestructural, denominado microglía oscura, ya había sido descrito previamente por Bisht et al. (2016b), asociándolo con situaciones patológicas como estrés crónico, envejecimiento y enfermedad de Alzheimer. En nuestro modelo APP/PS1, este tipo microglial muestra fagolisosomas electrodensos en su interior, cisternas del RER dilatadas y un núcleo muy electrodenso y con abundancia en heterocromatina. Estas características contrastan con las de la microglía interplaca, que tiene un citoplasma con electrodensidad moderada, abundantes cisternas del RER y mitocondrias, no muestra signos de fagocitosis, y presenta un núcleo con abundante eucromatina (Bisht et al. 2016b; Savage et al. 2018). En nuestro modelo, alrededor de las placas amiloides se observan también células microgliales con características intermedias entre la microglía con electrodensidad moderada y la microglía oscura. Esto sugiere que podría existir un proceso gradual por el cual la microglía pasa de un estado fisiológico funcional a un estado degenerativo/disfuncional. Más adelante se profundizará en la degeneración microglial observada en el modelo APP/PS1.

Por otro lado, la microglía activada en la enfermedad de Alzheimer, además de fagocitar A β , podría intervenir en la eliminación de sinapsis aberrantes (Kettenmann et al. 2013). Está descrito que, durante el desarrollo, la microglía participa en la poda sináptica mediada por el sistema del complemento. Este proceso parece reactivarse en la enfermedad de Alzheimer (Rajendran and Paolicelli 2018), de modo que las sinapsis aberrantes son marcadas por moléculas del sistema del complemento y fagocitadas por la microglía (Li and Barres 2018). En nuestro modelo, observamos que las distrofias neuríticas que rodean a las placas amiloides se hallan rodeadas por prolongaciones microgliales. Además, hemos obtenido evidencias a nivel ultraestructural de que la microglía podría participar en la pérdida sináptica, observando distrofias neuronales (la mayoría son de naturaleza presináptica; Sanchez-Varo et al. 2012) en el interior del cuerpo celular de la microglía. No obstante, este parece ser un evento poco frecuente en nuestro modelo APP/PS1, puesto que se ha observado en contadas

ocasiones. De hecho, en este modelo hemos demostrado que la fagocitosis y eliminación de distrofias presinápticas es un proceso que llevan a cabo de forma mayoritaria los astrocitos reactivos localizados también en la cercanía de las placas (Gomez-Arboledas et al. 2017). Al igual que en los astrocitos, la degradación de estas distrofias sinápticas por la microglía parece ser un proceso poco eficiente o disfuncional. En este sentido, resultados preliminares (no publicados) del grupo del Dr. Vitorica mediante ensayos *in vitro* con microglía primaria incubada con sinaptosomas de cerebro de animales APP revelan la incapacidad de estas células para degradar estas estructuras.

Microglía periplaca implicada en la formación de las placas amiloides

Debido a que la microglía se activa en la periferia de las placas, se ha asumido que las placas son responsables de la activación de la microglía, lo que en cierta manera apoya a la hipótesis de la cascada amiloide; sin embargo, es posible que sea la microglía la responsable de la formación/siembra de las placas. De hecho, en nuestro modelo todas las placas, grandes y pequeñas, están rodeadas por microglía presentando incluso una relación microglía/placa mayor las placas muy pequeñas. Como hemos discutido anteriormente, hemos observado la presencia de tinción positiva para Tioflavina-S (fibras amiloides) en el interior de la microglía. Aunque en ocasiones esta marca TioS-positiva estaba asociada a los lisosomas, también se observó que frecuentemente no colocalizaba con la marca positiva para LAMP1. Este hallazgo se observó tanto en microglía periplaca como en microglía en zonas interplaca. Por tanto, estas fibras amiloides no parecen tener un origen fagocítico, por lo que hipotetizamos que la microglía podría estar implicada en la fibrilación del A β /formación de placas. Existen evidencias muy recientes que apoyan que la microglía es necesaria para la formación de las placas amiloides (Sosna et al. 2018; Spangenberg et al. 2019). Mediante depleción de la microglía con un inhibidor de CSFR1 (PLX3397 o PLX5622) en las fases iniciales de la enfermedad en el modelo amiloidogénico 5xFAD se previene la formación de las placas amiloides (solo se formaron placas en aquellas regiones en las que persistía microglía), lo que indica claramente que la microglía es necesaria para la formación de dichas placas. La eliminación de la microglía una vez formadas las placas no tuvo efecto sobre la patología amiloide.

Para profundizar en esta hipótesis, se realizó un estudio a nivel ultraestructural empleando microscopía electrónica de transmisión. Mediante esta técnica se detectaron estructuras similares a las observadas en los estudios de microscopía láser confocal. En el hipocampo del modelo APP/PS1 había depósitos amiloides de muy pequeño tamaño totalmente rodeados por la microglía y en íntimo contacto con su cuerpo celular. Frecuentemente, no se apreciaba una membrana celular que separara el citoplasma microglial de las fibras amiloides. Esto sugiere que estos acúmulos amiloides se encuentran dentro del cuerpo celular de la microglía. La microglía que contiene estas fibras amiloides presenta características diferentes a la microglía que rodea a las placas de mayor tamaño. Se trata de microglía de electrodensidad moderada, no oscura, y con signos de una alta actividad biosintética en la zona de contacto con las fibras amiloides, ya que presenta gran cantidad de cisternas de RER y un núcleo muy eucromático situado cerca de las fibras amiloides. También muestra signos de un incrementado metabolismo energético, con numerosas mitocondrias también situadas cerca de las fibras amiloides. Esta microglía no presenta fagolisosomas

electrodensos de gran tamaño, por lo que no parece presentar gran actividad fagocítica. Además, el citoplasma de este tipo de microglía muestra un aspecto granuloso por la elevada cantidad de vesículas que contiene. Todas estas evidencias, sugieren que esta microglía está participando activamente en la formación de estas placas, quizás fagocitando el A β soluble del exterior y formando fibras amiloides en su interior. Si la fibrilación tuviese lugar dentro, esto podría producir la muerte de la microglía y la liberación hacia el espacio extracelular de las fibras de A β . En este sentido se ha observado mediante estudios *in vivo* con microscopía multifotón que la microglía internaliza A β , tras lo cual muere y lo libera al exterior pudiendo contribuir este mecanismo al crecimiento de las placas (Baik et al. 2016).

Otra posible explicación es que la microglía podría participar en la formación/crecimiento de las placas amiloides mediante mecanismos extracelulares. En relación con esto, hemos observado a nivel ultraestructural que las prolongaciones microgliales contactan de forma estrecha con las placas amiloides, de modo que frecuentemente no se distingue el límite entre la microglía y las fibras amiloides. En la zona de contacto microglía-placa hay una gran cantidad de mitocondrias y vesículas que se entremezclan con las fibras amiloides, sugiriendo un alto metabolismo energético y una posible secreción de moléculas y/o de vesículas hacia las placas. Estos signos podrían ser indicativos de que las prolongaciones microgliales están secretando sustancias que contribuyen a la formación de las placas amiloides.

Es posible que cambios funcionales de la microglía con la edad lleven a alteraciones en el proceso de formación de placas. En este sentido, el estudio cuantitativo de las placas por rangos de tamaño a lo largo del transcurso de la enfermedad en el modelo APP/PS1 reveló que el número de placas pequeñas (<200 μm^2) disminuía significativamente con la edad (ratones de 12-18 meses). Esto puede ser reflejo de una menor capacidad de nuclear nuevas placas. Sin embargo, las placas grandes aumentaban en número y tamaño, lo que indica que el proceso de crecimiento de las placas ya formadas no se veía afectado. Por tanto, el proceso de formación y crecimiento de las placas son mecanismos independientes.

La formación de las placas podría ser considerada como un mecanismo protector de la microglía, por el cual retiraría A β soluble del medio y lo secuestraría en estructuras insolubles menos reactivas. Es tentador especular que es la capacidad de la microglía para formar placas, y controlar su reactividad, lo que determina la eficiencia compensatoria del cerebro para soportar una elevada concentración de A β y prevenir el daño neuronal y los déficits cognitivos. Esta hipótesis explicaría la resiliencia a la enfermedad de los casos con elevada patología amiloide y sin manifestaciones clínicas. Por tanto, la idea de inhibir la activación microglial como terapia para el Alzheimer, sobre todo en fases iniciales, no parece una opción eficaz en vista de las funciones protectoras que realiza.

Microglía periplaca implicada en la compactación/agregación del A β

La microglía DAM parece ejercer otra función neuroprotectora en la EA al intervenir en la compactación de las placas amiloides, ya que la deficiencia de TREM2, que da lugar a una activación del fenotipo DAM incompleta, genera una reducción en la compactación de las placas amiloides, además disminuye el número de células microgliales periplaca y aumenta el

número de neuritas distróficas (Ulrich et al. 2014; Yuan et al. 2016). Las placas de los animales deficientes en TREM2 tienen una menor intensidad de tinción para Tioflavina-S y una morfología más difusa, con una mayor cantidad de fibrillas proyectando hacia el parénquima nervioso. Esto indicaría que tanto el propio TREM2, como alguno de los otros genes del perfil de activación DAM, probablemente participan en el mecanismo de compactación de las placas amiloides. Una mayor compactación de las placas parece reducir el daño neuronal (medido como formación de distrofias axonales/presinápticas), probablemente al evitar la liberación de A β hacia el parénquima.

El mecanismo de agregación del A β por parte de la microglía no es conocido. Una de las moléculas que podría participar en esta función es la galectina 3. El gen de la galectina 3, *LGALS3*, es uno de los que se sobreexpresan en la microglía con perfil transcriptómico DAM (Krasemann et al. 2017; Butovsky and Weiner 2018; Boza-Serrano et al. 2019). Este gen no solo se sobreexpresa en la enfermedad de Alzheimer, sino también durante el envejecimiento, en la esclerosis lateral amiotrófica y tras daño isquémico (Holtman et al. 2015; Burguillos et al. 2015). Se han identificado polimorfismos en el gen *LGALS3* que se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con Alzheimer, convirtiendo a este gen en un posible factor de riesgo para el desarrollo de Alzheimer (Boza-Serrano et al. 2019). El gen *LGALS3* codifica para la galectina 3, que presenta un dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos y un dominio N-terminal que permite que las moléculas de gal3 se unan entre sí. La galectina 3 es un ligando del receptor TLR4. Esta molécula sería secretada por la microglía y activaría a TLR4 desencadenando una respuesta proinflamatoria (Burguillos et al. 2015). La galectina 3 es también un ligando de TREM2, un receptor clave en la activación DAM (Boza-Serrano et al. 2019).

En cuanto a la relación de la galectina 3 con la patología de amiloide, esta molécula parece ser necesaria para que la microglía se active de forma completa en respuesta al A β fibrilar. La ausencia de galectina 3 en un modelo animal amiloidogénico provoca una activación microglial atenuada, con una disminución en la expresión de genes relacionados con la señalización de TLR y TREM2/DAP12. Además, tanto la delección como la deficiencia de galectina 3 dan lugar a una menor carga amiloide, así como una mejora en la capacidad cognitiva (Boza-Serrano et al. 2019; Tao et al. 2019). En este sentido, la galectina 3 estimula la producción de moléculas inflamatorias (como TNF α , IFN γ , IL-1 β) en presencia de A β (Ramírez et al. 2019), por lo que la ausencia de gal3 da lugar a una menor expresión de estas citoquinas proinflamatorias en respuesta a la patología amiloide y, por tanto, menor citotoxicidad (Boza-Serrano et al. 2019).

En nuestro estudio transcriptómico se detectó un aumento con la edad en los niveles de expresión de *LGALS3* en la microglía activada aislada del modelo APP. Esto coincide con la sobreexpresión de este marcador observada en el modelo 5xFAD en el trabajo de Boza-Serrano et al. (2019). Además, hemos observado que el área ocupada por las células galectina 3-inmunopositivas aumenta con la edad en la región CA1 hipocampal de nuestro modelo APP/PS1. Empleando doble marcaje para las placas amiloides y para la galectina 3, se detectó que la microglía gal3-positiva se localizaba mayoritariamente rodeando a las placas amiloides, presentaba morfología activada y además expresaba CD45 (marcador de activación). También, se observó que otros tipos celulares expresaban gal3 (neuronas y astrocitos), aunque lo hacían

de forma minoritaria. La microglía gal3-positiva no rodeaba a todas las placas amiloides de forma homogénea, solo a algunas. Esta distribución selectiva de la gal3 alrededor de algunas placas no parece depender del tamaño de estas ni de su localización, puesto que se observaron placas de diversos tamaños rodeadas y desnudas de microglía gal3-positiva, así como depósitos muy cercanos entre sí con y sin recubrimiento de células gal3-positivas. El motivo por el cual ocurre esto se desconoce, pero podría deberse a una diferente naturaleza o composición de ciertas placas amiloides que daría lugar a una sobreexpresión del marcador gal3 por parte de la microglía que las rodea. Estos resultados contrastan con lo observado por [Boza-Serrano et al. \(2019\)](#) en el modelo 5xFAD, donde se aprecia que la mayoría de la microglía alrededor de las placas coexpresa gal3 y TREM2. En nuestros experimentos empleando los marcadores gal3 y TREM2 por separado, se aprecia que el marcaje para TREM2 tiene lugar en número mayor de células microgliales y aparece alrededor de la mayoría de las placas amiloides, mientras que la marca para gal3 está en un número más reducido de microglía y no aparece en todas las placas. Esto sugiere que en nuestro modelo APP/PS1 la galectina 3 marca una subpoblación de células microgliales con fenotipo DAM (TREM2-positivas). Las diferencias entre estos dos modelos animales podrían deberse a que presentan distintas mutaciones relacionadas con el Alzheimer familiar. No obstante, se requieren estudios de colocalización entre TREM2 y gal3 en nuestro modelo APP/PS1.

Existen evidencias que indican que la galectina 3 participaría en la agregación del A β y compactación de las placas amiloides, puesto que la inyección intracerebral de esta molécula junto con monómeros de A β induce la formación de agregados de A β en animales no transgénicos, lo cual no ocurre en ausencia de galectina 3 ([Boza-Serrano et al. 2019](#)). La galectina 3 podría ser secretada por la microglía activada que rodea a las placas y liberada al espacio extracelular donde se uniría con las fibras amiloides, fomentando su agregación. Con el fin de identificar si en nuestro modelo APP/PS1 ocurre una secreción de la galectina 3 hacia las placas amiloides (no observamos inmunorreactividad gal3 en las placas a microscopía óptica), realizamos un estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión. Este estudio reveló que la gal3 se localizaba de forma mayoritaria en el citoplasma microglial, no obstante, en algunas ocasiones se observó marcaje positivo para gal3 sobre las fibras amiloides. Por tanto, en nuestro modelo no parece haber una clara secreción de galectina 3 hacia las placas amiloides. Aunque se ha descrito que la galectina 3 es liberada al espacio extracelular tras la estimulación con lipopolisacáridos e IFN- γ ([Li et al. 2008](#); [Jeon et al. 2010](#); [Burguillos et al. 2015](#)), esto ha sido observado en cultivos *in vitro*. Es posible que esta molécula a nivel extracelular sea lavada/eliminada durante el procesamiento histológico del tejido dificultando su visualización en los experimentos de inmunohistoquímica a microscopía óptica o electrónica.

Curiosamente, aunque la expresión de galectina 3 estaba mayoritariamente restringida a una subpoblación de microglía periplaca, en nuestro modelo APP/PS1 observamos una marcada acumulación de células gal3-positivas en la región de la fisura hipocámpal, con un patrón de localización muy similar en todos los animales APP/PS1 analizados. Esto, por el contrario, no ocurría en ratones silvestres, por lo que se trata de una característica asociada a la patología del modelo APP/PS1. Comprobamos que, además, estas células gal3-positivas son de origen mieloide puesto que coexpresan CD45. Esta acumulación de células gal3-positivas en

la fisura no estaba asociada a depósitos amiloides vasculares, por tanto, es posible que exista otro estímulo que está provocando la activación de estas células. Además, estos acúmulos parecen mayores en animales de edad avanzada en comparación con los animales jóvenes. Puesto que la región de la fisura hipocampal es rica en vasos sanguíneos, esta acumulación de células activadas podría corresponder a una infiltración de células periféricas debido a una mayor permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BHE). Estas células podrían ser microglía, pero también podría tratarse de macrófagos perivasculares o periféricos (que hayan adquirido fenotipo morfológico microglial), puesto que CD45 y galectina 3 no solo se expresan en la microglía sino también en los macrófagos activados (Sano et al. 2003; Prinz et al. 2017). Está descrito que ocurre una disfunción de la BHE en varias enfermedades del sistema nervioso central, incluyendo la esclerosis múltiple, tumores cerebrales, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Ogata et al. 2019). Además, mediante resonancia magnética de contraste, se ha visto que en el cerebro humano *in vivo* se produce una disrupción de la BHE en el hipocampo con la edad, que se ve agravada en las personas con deterioro cognitivo leve (Montagne et al. 2015). Por tanto, en nuestro modelo amiloidogénico también podrían ocurrir alteraciones en la BHE asociadas a la edad que darían lugar a la entrada de macrófagos a través de los vasos de la fisura hipocampal. Otra posibilidad es que estas células gal3+/CD45+ que se encuentran en la fisura sean de naturaleza microglial y estén activadas en respuesta a una posible entrada de macrófagos periféricos por los vasos de la fisura, que la microglía está tratando de eliminar. Para determinar si estas células son microgliales o macrófagos, son necesarios futuros estudios empleando marcadores específicos de microglía (TMEM119, marca la microglía homeostática y la activada) y específicos de macrófagos perivasculares (MRC-1, CD163) y macrófagos periféricos (CCR2).

En relación con la agregación del A β y compactación de las placas amiloides, otra de las moléculas a las que se le ha atribuido esta función es ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). En la enfermedad de Alzheimer, la microglía libera una serie de moléculas proinflamatorias que pueden agregarse y dar lugar a complejos denominados inflamomas. Uno de los inflamomas más estudiados es NLRP3, el cual, al activarse, recluta a ASC, promoviendo su agregación y fibrilación dando lugar a complejos denominados ASC specks. Estos ASC specks, además de intervenir en la inflamación, podrían participar en la agregación del A β dando lugar a las placas amiloides (Heneka et al. 2013; Venegas et al. 2017; Abbott 2018; Heneka et al. 2018). En relación a esto, Venegas et al. (2017) observaron que la inyección de ASC specks inducía la propagación de la patología amiloide en un modelo amiloidogénico. Además, observaron marca ASC-positiva en el core de las placas amiloides en un modelo amiloidogénico y en muestras humanas mediante estudios de inmunofluorescencia.

Para determinar si ASC se secretaba hacia el core de las placas amiloides en nuestro modelo APP/PS1, primero realizamos un estudio de inmunofluorescencia. En contra a lo observado por Venegas et al. (2017), en nuestro modelo, ASC se localizaba dentro de la microglía Iba1-positiva que rodeaba a las placas amiloides, asociado principalmente al citoplasma y la membrana plasmática. No observamos marca fuera de las células ni en el core de las placas amiloides. Para estudiar esto en mayor profundidad, se llevó a cabo un estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión, en el que observamos que

ASC se localizaba de forma mayoritaria en el citoplasma de la microglía periplaca. De forma anecdótica, se observó marca ASC-positiva sobre algunas fibras amiloides. Por tanto, en nuestro modelo APP/PS1, ASC no parece secretarse hacia el core de las placas amiloides para promover la agregación de las placas, o bien esta molécula en el compartimento extracelular es difícil de preservar durante el procesamiento histológico.

Microglía periplaca como barrera para aislar las placas amiloides

Estudios recientes demuestran que la microglía periplaca positiva para TREM2 rodea a las placas amiloides e interviene en la envoltura y aislamiento de estas, confinando su toxicidad (Condello et al. 2015, 2018). Las prolongaciones microgliales, ricas en TREM2, rodean de forma muy estrecha a las placas amiloides aislándolas. La deficiencia en TREM2 da lugar a placas amiloides con una envoltura microglial dramáticamente menor, mientras que el número de células microgliales asociadas a las placas no se reduce tanto (Yuan et al. 2016). Por tanto, la deficiencia en TREM2 afectaría a la capacidad de la microglía de polarizar sus prolongaciones hacia la superficie de las placas amiloides, impidiendo que se cree una barrera eficiente alrededor de estas. Esto da lugar a placas menos compactas, con fibras amiloides más ramificadas y con una mayor superficie de exposición de A β , lo cual genera una mayor patología neurítica alrededor de las placas (Yuan et al. 2016). Esto sugiere que los individuos que presentan la variante R47H de TREM2 (Jonsson et al. 2013; Guerreiro et al. 2013), y que produce una pérdida de función de este receptor, presentan un mayor riesgo de padecer EA, probablemente debido a que, entre otras causas, tengan una microglía con menor capacidad de aislar a las placas amiloides.

En nuestro estudio transcriptómico en microglía de ratones APP, *TREM2* era uno de los genes DAM cuya expresión aumentaba drásticamente con el avance de la enfermedad. Además, en estudios inmunohistoquímicos observamos la íntima relación entre la microglía TREM2-positiva y las placas amiloides. La patología amiloide y la activación microglial para TREM2 aumentaban en paralelo en la región CA1 hipocampal de nuestros animales entre los 4 y los 12 meses, sin embargo, entre los 12 y los 18 meses la activación microglial se frenaba a pesar de que la patología amiloide seguía agravándose. Como se ha comentado anteriormente, esto mismo ocurría también con el marcador de activación microglial CD45. Esto podría indicar que está ocurriendo un proceso de disfunción microglial en los animales viejos, y que la microglía no puede responder adecuadamente al progresivo proceso de amiloidosis (ver apartado 4.1 de la Discusión). De hecho, en nuestro modelo hemos identificado signos ultraestructurales de degeneración microglial que discutiremos más adelante.

Al estudiar en detalle la relación entre la microglía TREM2-positiva y las placas amiloides en nuestro modelo, observamos que la microglía periplaca inmunomarcada para TREM2 introduce sus prolongaciones hacia el interior de la placa y crea una especie barrera en forma de anillo alrededor del core de las placas. Al igual que en nuestros experimentos, Yuan et al. (2016) observan una elevada expresión de TREM2 en las prolongaciones microgliales que están en contacto con el core de las placas amiloides. En nuestro modelo APP/PS1 también obtuvimos evidencias a nivel ultraestructural de la importancia de TREM2 en la envoltura microglial de las placas amiloides. A microscopía electrónica de transmisión, las fibras

amiloides se hallaban completamente rodeadas por prolongaciones microgliales positivas para TREM2 que se entrelazaban de forma muy intrincada con las fibras amiloides. Estas prolongaciones microgliales tan estrechamente relacionadas con las placas amiloides, no solo eran positivas para TREM2 sino también para otra serie de marcadores de microglía activada como CD45 y galectina 3. Esto pone de manifiesto la importancia que tiene la microglía con activación DAM en la envoltura y aislamiento de las placas amiloides.

Una cuestión importante a determinar es si con la progresión de la enfermedad disminuye esta función de barrera de la microglía periplaca. En apoyo a esta idea, nuestros datos en el modelo APP/PS1 indican que a edades avanzadas existe pérdida de envoltura microglial CD45-positiva alrededor de las placas amiloides en comparación con animales jóvenes donde la patología es menos agresiva, lo que apoyaría una pérdida de función protectora de la microglía con el transcurso de la patología. El aumento de los niveles de A β oligomérico soluble y la pérdida neuronal en el hipocampo de nuestro modelo a edades avanzadas (Jimenez et al. 2008) podría ser consecuencia de esta pérdida de barrera microglial sobre las placas. Para dilucidar en mayor detalle la implicación funcional de la microglía activada en la patología amiloide, y en general en la patogénesis de la EA, en la actualidad estamos desarrollando modelos APP_{SL} con ablación microglial (supresión genética condicional del receptor CSF1R, en los que la supervivencia microglial puede ser disminuida a la edad elegida, antes de la patología, o con la patología avanzada), y otros en los que se induce atenuación de su respuesta (APP/TREM2KO, APP/TLR4KO, y APP/TLR2KO).

En los apartados anteriores hemos discutido una serie de funciones que podrían ser atribuidas a la microglía activada, como la fagocitosis de A β , la formación y compactación de A β y la envoltura/aislamiento de las placas amiloides. Estas funciones podrían ser beneficiosas, puesto que la microglía trataría de contener la toxicidad del A β en las placas amiloides, formándolas, aislándolas y compactándolas. De este modo, el A β estaría en una forma menos tóxica, disminuyendo la cantidad de oligómeros solubles libres en el parénquima nervioso. No obstante, como resultado de la activación microglial también ocurre la liberación de sustancias proinflamatorias que causan neurotoxicidad. Es posible que la microglía tenga un efecto protector al inicio de la patología amiloide pero que en las fases avanzadas su activación sea insuficiente, o se vea mermada por un estado de activación crónico, para contener el daño que se está produciendo. Con la progresión de la enfermedad, la microglía podría aumentar su actividad citotóxica (liberación de citoquinas proinflamatorias) en detrimento de sus funciones positivas (agregación y aislamiento de las placas). En este sentido, la microglía podría sufrir un proceso degenerativo durante la enfermedad de Alzheimer, aunque en menor medida a lo que hemos descrito que ocurre en muestras *post mortem* de pacientes (Sanchez-Mejias et al. 2016). Este aspecto lo discutimos en el apartado siguiente.

4.2.4. LA MICROGLÍA PERIPLACA MUESTRA SIGNOS DE DEGENERACIÓN

En el hipocampo de pacientes con Alzheimer, además de darse una activación microglial mucho menor que en los modelos amiloidogénicos, nuestro grupo ha descrito que existe degeneración microglial (Sanchez-Mejias et al. 2016; Navarro et al. 2018; Gutierrez and Vitorica 2018). Esta microglía patológica presenta prolongaciones fragmentadas, dilataciones esferoidales y distrofias en sus prolongaciones. Además, se produce una disminución en el

número de células microgliales, así como una disminución en el dominio microglial, es decir, en el área del parénquima cerebral que es vigilado/protegido por cada célula microglial. Esta degeneración microglial está asociada a la acumulación de fosfo-Tau soluble en el hipocampo de los pacientes. Esta patología microglial no se observa claramente en los modelos animales amiloidogénicos, seguramente debido a que estos apenas presentan fosfo-Tau soluble. Hasta ahora, no se han descrito alteraciones patológicas en la microglía en modelos murinos asociadas con el avance de la enfermedad. En el cerebro de ratones, al contrario que en humanos, el envejecimiento normal no va acompañado de cambios degenerativos en la microglía (Streit et al. 2014). Sin embargo, teniendo en cuenta los profundos cambios degenerativos de la microglía en pacientes, es fundamental analizar si en los modelos amiloidogénicos la microglía sufre también alteraciones morfológicas.

Como marcador de disfunción/senescencia microglial, hemos empleado la ferritina. La ferritina se encarga del almacenamiento de hierro y su sobreexpresión indica una menor eficiencia en el mantenimiento de la homeostasis del hierro y un mayor estrés oxidativo. En las muestras humanas, la microglía que expresa ferritina normalmente presenta alteraciones morfológicas (distrofias), ocurriendo esto principalmente en individuos de edad avanzada y en sujetos con Alzheimer (Lopes et al. 2008; Angelova and Brown 2019). Nuestro grupo ha descrito que en muestras de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) la microglía presenta un marcaje ferritina-positivo más abundante que las muestras de individuos controles Braak II (no dementes), tanto en CA1 como en subículo (Sanchez-Mejias 2015). En nuestro modelo APP/PS1 observamos que la cantidad de marca inmunorreactivo para ferritina en la región CA1 hipocampal aumentaba con la edad. La ferritina se expresaba principalmente en la microglía pero también la expresaban algunos oligodendrocitos, aunque de forma minoritaria. La microglía ferritina-positiva se hallaba siempre asociada a las placas amiloides y sólo una parte de la microglía periplaca activada expresaba dicho marcador, indicando que podría tratarse de una subpoblación microglial que está entrando en un estado degenerativo. A nivel ultraestructural, este marcador se expresaba en el citoplasma microglial, tanto en las prolongaciones como en el cuerpo celular. Al comparar las placas de CA1 de ratones APP/PS1 jóvenes y viejos, observamos cambios a nivel cualitativo que se confirmaron al realizar un análisis cuantitativo del recubrimiento microglial ferritina-positivo. Con la edad, el recubrimiento microglial positivo para CD45 alrededor de la placa disminuía a la vez que aumentaba el positivo para ferritina. Esto nos sugiere que la microglía podría estar sufriendo una pérdida de activación y entrando en un proceso degenerativo. Esta cuantificación reveló que el recubrimiento de las placas amiloides no solo dependía de la edad, sino también del tamaño de las placas amiloides. Las placas de pequeño tamaño estaban más recubiertas por microglía, tanto CD45-positiva como ferritina-positiva, que las placas grandes. Por tanto, con la progresión de la patología, el core de las placas amiloides va aumentando de tamaño, pero el recubrimiento microglial no crece a la par que la placa, por lo que los depósitos grandes están más desnudos de microglía y por ello presentan una mayor toxicidad en cuanto a número de distrofias que las rodean. Además de este cambio en la cantidad de recubrimiento por parte de microglía activada (CD45) y microglía senescente (ferritina), también detectamos cambios en el número de células microgliales ferritina-positivas alrededor de las placas. En animales viejos se producía un aumento significativo en el número de células periplaca Iba1-positivas que presentaban marcaje para ferritina. Esto indica que una parte de la población microglial que

rodea a las placas está en proceso de degeneración, siendo mayor en fases avanzadas de la enfermedad.

En concordancia con esta hipótesis, hemos detectado en las prolongaciones microgliales la presencia de engrosamientos con aspecto de estructuras distróficas, similares a las observadas en las prolongaciones axonales. A nivel ultraestructural, estas distrofias microgliales presentaban gran cantidad de vesículas en su interior de tamaño variable y contenido electrodensito heterogéneo. Mediante inmuno-oro para CD45 e Iba1, confirmamos que estas distrofias eran de naturaleza microglial. Las distrofias microgliales se hallaban cerca de las placas amiloides, lo cual sugiere que estos depósitos podrían tener un efecto tóxico sobre las prolongaciones de la microglía. La presencia de distrofias microgliales (prolongaciones engrosadas y fragmentadas) es un rasgo morfológico que indica senescencia y ha sido descrita en la microglía de personas de edad avanzada y pacientes con Alzheimer (Streit et al. 2009, 2014).

Además de las distrofias, nuestro estudio ultraestructural nos ha permitido observar otros rasgos morfológicos que apoyan la hipótesis de disfuncionalidad en la microglía periplaca del modelo APP/PS1. Como hemos discutido anteriormente, a microscopía electrónica de transmisión se observa un subtipo microglial alrededor de las placas amiloides que presenta una elevada electrodensidad, la microglía oscura. Este tipo de microglía ha sido descrita también por otros autores (Bisht et al. 2016b) y se observa en el envejecimiento, estrés crónico y enfermedad de Alzheimer. La microglía oscura de nuestro modelo presenta signos de disfuncionalidad, como la presencia de cisternas del RER dilatadas y un núcleo muy electrodensito y rico en heterocromatina, lo cual indica que estas células tienen una baja actividad transcripcional y biosintética. La dilatación de las cisternas del RER se ha descrito como un signo de estrés oxidativo, debido a una elevada cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Esto llevaría a disfunción celular debido a que las vías metabólicas y los procesos fisiológicos se ven alterados. El estrés oxidativo también suele producir encogimiento celular, lo cual hace que se condense el contenido citoplasmático y explicaría la elevada electrodensidad de este subtipo microglial (Bisht et al. 2016a). Además, la microglía oscura de nuestro modelo suele presentar fagolisosomas de contenido electrodensito y de gran tamaño en su citoplasma. Como se comentó anteriormente, estos fagolisosomas podrían formarse por la fagocitosis de A β por parte de la microglía, ya que presentan contenido de aspecto fibrilar. Es posible que la microglía no sea capaz de digerir completamente el contenido de estos cuerpos fagocíticos y esto genere toxicidad y degeneración microglial. Además, se observan células microgliales periplaca que presentan un estado intermedio entre la microglía de electrodensidad moderada y la microglía oscura, lo cual puede indicar que el paso de estado funcional a degenerativo sería gradual.

Es de destacar que la microglía periplaca de nuestro modelo también presenta alteraciones morfológicas en las mitocondrias. Se observaron mitocondrias con morfología anómala (arriñonada, muy alargada, zonas con estrangulaciones), crestas dilatadas e irregulares, y huecos que no presentaban crestas. A veces se observaban también signos de autofagia en el interior de las mitocondrias microgliales. Esto lo observamos principalmente en la microglía periplaca de electrodensidad moderada, ya que la microglía oscura presenta un citoplasma muy electrodensito que imposibilita la visualización clara de las mitocondrias. Estas

alteraciones mitocondriales no se visualizaron en la microglía interplaca. La calidad de las mitocondrias está regulada por la mitofagia, que es el proceso por el cual se eliminan las mitocondrias dañadas. Por tanto, la presencia de estas aberraciones mitocondriales en la microglía periplaca indica que la mitofagia está afectada. Esto afectaría a la neuroinflamación, puesto que su disrupción hace que se acumulen mitocondrias disfuncionales que liberan especies reactivas de oxígeno. Estas especies a su vez activan al inflamasoma NLRP3. A su vez, la neuroinflamación induce un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias, las cuales promueven la liberación de factores proapoptóticos hacia el citoplasma microglial (Lautrup et al. 2019). Se ha visto que la liberación al espacio extracelular de mitocondrias disfuncionales por parte de la microglía causa muerte neuronal y activa a los astrocitos en enfermedades neurodegenerativas (Joshi et al. 2019). Por otra parte, la inducción de la mitofagia reduce neuroinflamación y mejora la capacidad fagocítica (Lautrup et al. 2019).

Respecto a las posibles causas que llevan a la degeneración microglial, es posible que su exposición continua al A β y a un entorno patológico sea perjudicial para estas células. En este sentido, la microglía está equipada con una batería de receptores de superficie celular (Hickman et al. 2013), muchos de los cuales se unen a oligómeros y fibrillas de A β solubles (Lucin and Wyss-Coray 2009), a fosfolípidos y otros patrones moleculares asociados con el daño (DAMPs) liberados por las neuronas dañadas. Por otro lado, es posible que un ambiente hipóxico alrededor de las placas dañe también a la microglía. Datos no publicados en colaboración con el Dr. Alberto Pascual (Ibis) revelan que el módulo génico microglial inducido por HIF1/hipoxia está enriquecido en la microglía periplaca del modelo APP/PS1 utilizado en esta Tesis Doctoral. De hecho, se ha descrito que una hipoperfusión vascular sistémica y la hipoxia contribuyen a la EA (Zlokovic 2011). En apoyo a un ambiente hipóxico en el cerebro con EA, datos del laboratorio del Dr. Vitorica (no publicados) demuestran que la expresión de HIF1a está elevada en los pacientes Braak V-VI. Por tanto, podemos especular que una reducción del flujo sanguíneo cerebral en los individuos envejecidos, y el consecuente ambiente hipóxico, podrían contribuir a la degeneración microglial en fases avanzadas de la enfermedad.

Para finalizar, y a modo de resumen en la **figura 4.1** se muestra un esquema de la relación funcional de la microglía activada con las placas amiloides y los cambios con la progresión de la enfermedad.

Como reflexión final, y teniendo en cuenta las funciones protectoras de la microglía activada periplaca y la pérdida de función de estas células con el avance de la enfermedad, sería de gran interés el desarrollo de terapias dirigidas a restaurar la función microglial para reducir así el efecto tóxico de las placas y el daño neuronal. Hasta ahora, en el ámbito de la enfermedad de Alzheimer ha dominado la visión clásica de una activación microglial citotóxica en respuesta a la acumulación de proteínas tóxicas, sin embargo, los últimos avances en este campo y los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral apuntan a la microglía activada como una respuesta del SNC dirigida a controlar la patología amiloide.

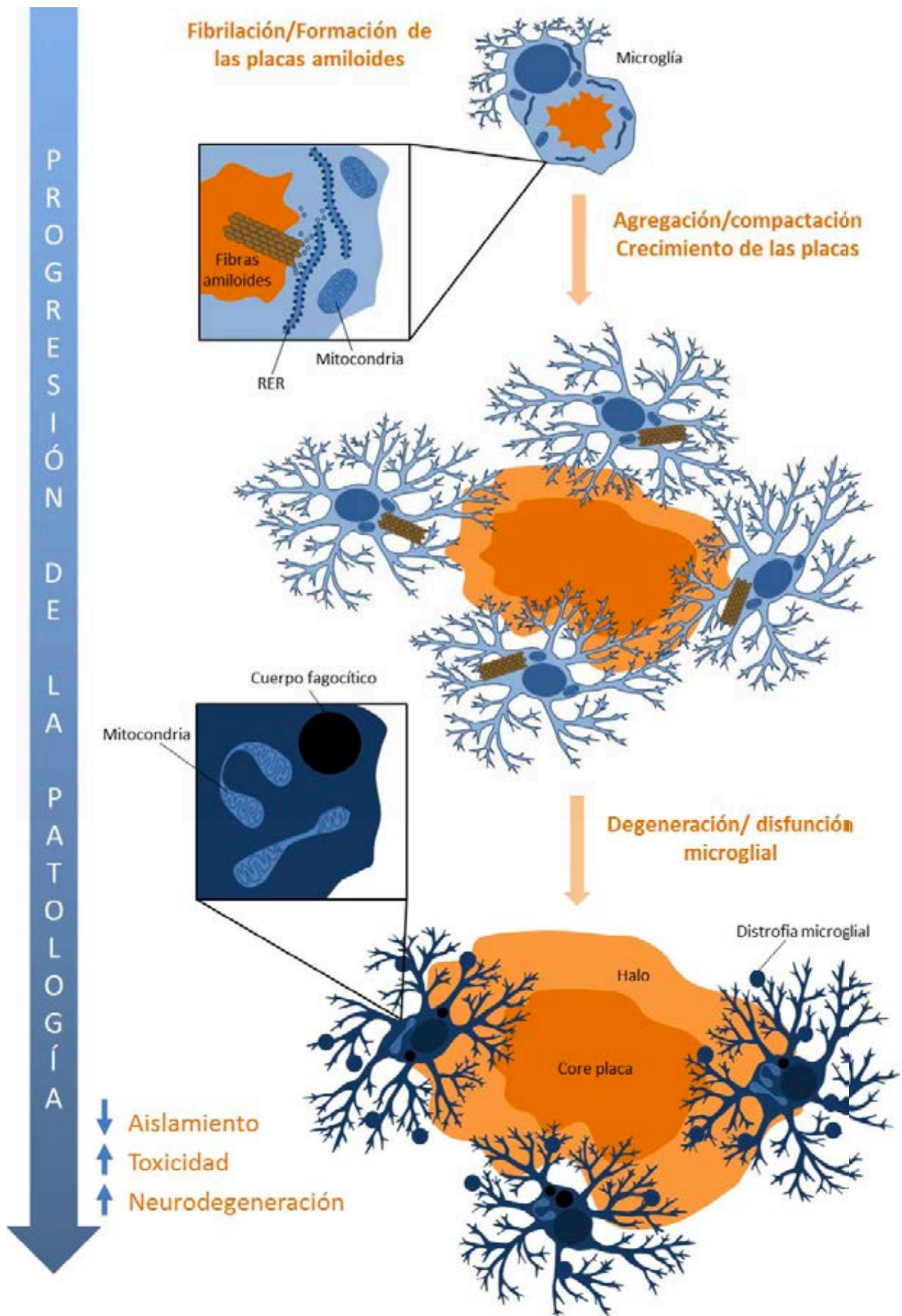


Figura 4.1. La microglía interviene en el proceso de formación, compactación y aislamiento de las placas amiloides y sufre un proceso de degeneración con la progresión de la patología. Las placas amiloides podrían iniciar su formación en el interior de la microglía. La presencia de cisternas de RER y vesículas en el citoplasma de la microglía próximas a las fibras amiloides, sugiere que estas células sintetizarían moléculas que favorecerían la agregación/fibrilación del A β dando lugar a fibras amiloides. Alcanzado un cierto tamaño, estos pequeños acúmulos fibrilares podrían liberarse al espacio extracelular. En el parénquima, los depósitos aumentarían en tamaño, creciendo tanto el core como el halo oligomérico, proceso que también podría estar regulado por la microglía. De este modo, los oligómeros solubles de A β pasarían a formar parte de las placas, acumulándose de forma menos tóxica. Las prolongaciones microgliales interaccionan íntimamente con las placas y se encargan de envolverlas/aislarlas, pero también de compactarlas. Conforme la placa va aumentando en tamaño, la microglía la envuelve de una forma menos eficiente y por tanto se genera una mayor toxicidad a su alrededor en forma de neuritis distróficas. Con la progresión de la patología, la microglía periplaca sufre un proceso degenerativo en el cual disminuiría la expresión de CD45 y aumentaría la cantidad de ferritina. Esto se correspondería con un proceso de degeneración microglial en el que se observan alteraciones ultraestructurales (citoplasma muy electrodens, cisternas del RER dilatadas, mitocondrias alteradas, cuerpos fagocíticos electrodensos, distrofias microgliales). Esta degeneración provocaría que la microglía no pueda realizar sus funciones de manera correcta, produciéndose un incremento en la toxicidad de las placas amiloides y daño neuronal.

4.3. EL A β SOLUBLE DE PACIENTES DE ALZHEIMER Y DE MODELOS AMILOIDOGÉNICOS ACTÚA COMO SEMILLA Y ACELERA LA PATOLOGÍA AMILOIDE *IN VIVO*

Pese a que en las últimas décadas ha habido grandes avances en el conocimiento de la enfermedad de Alzheimer, aún no se conoce bien el mecanismo por el cual la patología amiloide y la patología fosfo-Tau se extienden por el cerebro. La acumulación de A β precede a la acumulación de Tau y comienza entre 10 y 20 años antes del inicio de los síntomas (Long and Holtzman 2019). Por ello, el A β se considera el factor desencadenante de la cascada patológica que lleva al deterioro cognitivo y demencia (Hardy and Higgins 1992; Hardy and Selkoe 2002; Selkoe and Hardy 2016). Además, estudios recientes sobre el patrón regional de progresión de la neuropatología del A β y fosfo-Tau indican que la EA podría tener un mecanismo de propagación similar a las enfermedades priónicas (Morales et al. 2012; Duran-Aniotz et al. 2013; Fritsch et al. 2014a; Stancu et al. 2015; Usenovic et al. 2015; Kaufman et al. 2016; Wang et al. 2017b; Woerman et al. 2016; Olsson et al. 2018). Es necesario, por tanto, profundizar en el conocimiento de los mecanismos por los cuales A β se propaga para identificar posibles dianas que impidan su diseminación.

En esta Tesis Doctoral hemos realizado inyecciones intracerebrales de fracciones solubles procedentes del cerebro de pacientes con Alzheimer (Braak V-VI) y de animales transgénicos amiloidogénicos (APP_{751SL}/PS1_{M146L} de 18 meses). Dichas inyecciones se realizaron en modelos animales de las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer (APP_{SL}, 3xTgAD) y en un nuevo modelo de la forma esporádica de la enfermedad (hA β -KI). Además, se emplearon animales WT para comprobar una posible formación de placas de *novo*. Los experimentos en los modelos 3xTgAD y hA β -KI se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (University of California Irvine, EEUU) durante una estancia predoctoral.

De hecho, ambos modelos han sido desarrollados por dicho laboratorio (Oddo et al. 2003; Baglietto-Vargas et al. 2019, *Nat Comm*, en revisión).

En el modelo APP, tras 4 meses post-inyección con fracciones solubles, tanto de Braak V-VI como de APP/PS1 de 18 meses, se produjo una aceleración significativa de la patología amiloide en el hipocampo con respecto a los controles. En consonancia con el aumento de la cantidad de placas fibrilares, ocurría también un aumento en la activación microglial. En los animales tratados con fracciones solubles, no se observaron diferencias en cuanto a la carga amiloide/glial entre el hemisferio ipsilateral (inyectado) y contralateral (no inyectado), teniendo ambos hemisferios una mayor patología que los animales inyectados con PBS. Esto podría deberse a que el periodo de incubación de 4 meses post-inyección es suficiente para que la patología debida a las inyecciones se propague hacia el hemisferio contralateral, ya que en este modelo la patología amiloide está muy avanzada a los 8 meses de edad y este tiempo de incubación parece ser suficiente por la preexistente carga amiloide. Aunque ambos inóculos causan una aceleración de la patología, las muestras de APP/PS1 parecen tener una capacidad algo mayor en cuanto a estimular la formación de depósitos fibrilares que las fracciones solubles de Braak V-VI. Uno de los motivos por los cuales la inducción del inóculo de ratón es mayor que la observada con muestras humanas puede ser debido a la cantidad de semillas en el inóculo. Como se ha mostrado, los animales APP/PS1 de 18 meses tienen una mayor carga amiloide que los pacientes de Alzheimer y, proporcionalmente, tienen mayor concentración de A β y semillas que aceleran la agregación o contienen más unidades competentes de inducir nucleación. Es posible también que otros componentes presentes en el inóculo de ratón favorezcan la agregación y al ser de origen murino potencien más esta acción en el ratón que componentes humanos en un ambiente murino. Las semillas de A β que presentan las fracciones solubles de pacientes con EA y animales transgénicos podrían tener, además, distinta naturaleza. En relación con esto, se ha visto que el péptido A β con conformación nativa se puede plegar de forma alternativa y dar lugar a distintos tipos estructurales de conformaciones o cepas, los cuales pueden tener distinta toxicidad y capacidad de nucleación (Petkova et al. 2005; Morales et al. 2015b; Eisele and Duyckaerts 2016). Además, se ha observado que en diferentes modelos animales amiloidogénicos se forman distintas semillas de A β y que cuando se inyectan las semillas propias de un modelo en otro modelo estas son capaces de cambiar la proporción de A β ₄₀/A β ₄₂ de las placas que se forman (Meyer-luehmann et al. 2006; Heilbronner et al. 2013; Morales et al. 2015b). También existe la posibilidad de que distintos tipos de proteínas con plegamiento alternativo interaccionen entre sí y potencien su agregación mutuamente (*cross-seeding*). Se ha observado que la administración de agregados de A β promueve la agregación de Tau en modelos animales transgénicos. Sin embargo, este mecanismo es unidireccional y no se ha encontrado que Tau sea capaz de inducir la agregación de A β , por lo que, en principio, la presencia de Tau en las muestras de humanos con EA no induciría una mayor agregación de A β , aunque debido a la toxicidad de los agregados de Tau, la presencia de este podría influir en la respuesta inflamatoria y procesos neurodegenerativos (Lewis 2001; Gotz et al. 2001; Morales et al. 2013). Por tanto, en nuestros experimentos, aunque tanto las fracciones solubles de Braak V-VI como las de APP/PS1 inducen una aceleración de la patología amiloide similar, las pequeñas diferencias que observamos entre ambos tipos de inóculos podrían deberse a que contienen distintas especies o concentraciones de semillas A β .

Es de destacar que en el hemisferio inyectado, tanto con S1 de Braak V-VI como de APP/PS1, tuvo lugar la acumulación de placas amiloides OC-positivas y TioS-positivas en la zona del *alveus*, lo cual no ocurría en el hemisferio no inyectado ni en los animales inyectados con PBS. Esto estuvo acompañado también de una fuerte activación microglial en esta región. El *alveus* es una capa de sustancia blanca formada por los axones mielínicos. El *alveus* contiene fibras axonales de las distintas regiones del hipocampo y se combinan en la fimbria o fórnix, una de las principales vías de salida de información del hipocampo. Además, contiene las proyecciones que provienen de la corteza entorrinal contralateral, que finalmente conecta con el hipocampo contralateral. Esto indicaría que la agregación acelerada que se está produciendo en el hipocampo ipsilateral se propagaría vía sináptica hacia el hipocampo contralateral de forma retardada, apareciendo inducción de la agregación en el otro hemisferio. Existe una buena correlación entre la carga amiloide y la activación microglial. Esto indicaría que esta inflamación está íntimamente asociada al aumento de la carga amiloide y no es consecuencia de la inyección o cirugía, ya que no se puede observar en los animales WT inyectados, donde no existe inducción de la agregación. Sin embargo, la relación de la microglía con la propagación del A β no es conocida. Es posible que estas células inmunes intervengan en el proceso de diseminación de esta proteína patogénica. De hecho, se ha demostrado que la microglía contribuye a la propagación de la patología de Tau (Maphis et al. 2015). Es más, la microglía participa en este proceso vía liberación de exosomas (Asai et al. 2015). La microglía fagocita fosfo-Tau (Perea et al. 2018) y secreta eficientemente microvesículas, particularmente exosomas, como parte de los mecanismos de liberación de citoquinas y presentación de antígeno (EL Andaloussi et al. 2013). La propagación de las formas patológicas de Tau y, de ser demostrado, de A β por parte de la microglía sería un mecanismo no sináptico de propagación. La transferencia de proteínas patogénicas vía exosomas podría ser un mecanismo de propagación aplicable a las diferentes proteinopatías neurodegenerativas. Por lo tanto, la propagación que observamos en este modelo APP podría producirse tanto de forma sináptica, mediante las conexiones axonales de regiones físicamente alejadas pero interconectadas, como de forma no sináptica, favorecida por la microglía cuya motilidad y capacidad de secreción intervendría en la propagación de forma más localizada. Identificar la participación de la microglía, así como otros mecanismos implicados en la propagación y progresión de la enfermedad, es de gran interés para desarrollar herramientas terapéuticas que frenen el proceso de propagación entre regiones cerebrales, evitando la progresión de la enfermedad.

En la enfermedad de Alzheimer, tanto A β como fosfo-Tau podrían propagarse de forma parecida a los priones. El A β puede presentar conformación alternativa que le confiere una mayor capacidad de agregación y facilita que los monómeros de A β se agreguen dando lugar a dímeros, oligómeros, protofibrillas, fibrillas y, finalmente, placas amiloides (Moreno-Gonzalez and Soto 2011; Eisele and Duyckaerts 2016; Arbor et al. 2016; Yuksel and Tacal 2019). Además de presentar una mayor capacidad de agregación, el A β con conformación alternativa podría servir como molde o semilla para que monómeros con conformación nativa se plieguen también de forma patológica (Eisele and Duyckaerts 2016). Este posible mecanismo de propagación de A β se ve apoyado por el hecho de que al añadir agregados o semillas de A β a una solución de A β monomérico soluble, se acorta el tiempo de nucleación y formación de agregados *in vitro* (Harper and Lansbury 1997). Además, se han realizado estudios *in vivo* en

los cuales se ha observado un incremento de la patología amiloide en modelos amiloidogénicos tras la inyección intracerebral de homogeneizados y fracciones solubles de cerebros de pacientes con Alzheimer, personas de edad avanzada sin demencia y personas con deterioro cognitivo leve (Kane et al. 2000; Duran-Aniotz et al. 2013; Frittschi et al. 2014a). En el cerebro de estos individuos, no solo hay A β , sino que también hay fosfo-Tau y otras proteínas que podrían estar implicadas en la agregación y propagación de A β . No obstante, al deplecionar el A β de estas muestras e inyectarlas en un modelo amiloidogénico, se veía reducida su capacidad de acelerar la patología amiloide. Esto indica que el principal agente responsable de la propagación de estos agregados proteicos sería el propio A β (Duran-Aniotz et al. 2014). Los homogeneizados cerebrales de animales amiloidogénicos, que principalmente contienen A β , también son capaces de acelerar la patología amiloide *in vivo*, tal y como se ha visto cuando en animales APP jóvenes se inyectan homogeneizados de cerebro a APP viejos (Morales et al. 2015a). Además, la inyección de homogeneizados cerebrales de pacientes con EA produce la aparición de placas amiloides de *novo* en un modelo humanizado que presenta la secuencia del APP humano no mutado, el cual en condiciones normales no desarrolla placas (HuAPPwt) (Morales et al. 2012). Esto refuerza los resultados obtenidos en los animales WT inyectados con los diferentes inóculos, en los que no hemos encontrado inducción de la patología, seguramente debido a la falta de sustrato (A β monomérico humano) para la conversión en agregados, ya que se sabe que la secuencia del A β murino difiere en tres aminoácidos que hacen al péptido del ratón menos amiloidogénico que el humano (Jankowsky et al. 2007). Sin embargo, en animales WT no humanizados también se puede inducir la formación de placas amiloides cuando se inyectan monómeros de A β junto con galectina 3, sugiriendo que esta podría actuar como co-factor de agregación para el A β (Boza-Serrano et al. 2019). Estos depósitos no solo aparecen en la zona de inyección, sino que también pueden observarse en regiones alejadas, sugiriendo que existe un mecanismo de propagación similar al de los priones.

Además, se realizó el análisis de propagación inyectando la fracción soluble de la corteza frontal de un paciente Braak VI en el modelo 3xTgAD, que sobreexpresa las secuencias humanas de APP, Tau y PS1. En este modelo, se analizó cómo la extensión del periodo de incubación (desde la inoculación hasta la evaluación de la patología) puede influir en la eficiencia de la propagación. En el modelo 3xTgAD, a los 5 meses post-inyección, se produjo un aumento en la patología amiloide en el hemisferio inyectado respecto a los animales inyectados con PBS. No obstante, aunque se produjo una aceleración de la patología amiloide en el hipocampo inyectado, este periodo de incubación de 5 meses no fue suficiente como para que se produjera una propagación de las semillas de A β y aceleración de la agregación desde el hemisferio ipsilateral (inyectado) hacia el hemisferio contralateral (no inyectado). Estos resultados contrastan con lo que se ha observado en el modelo APP, en el cual 4 meses de incubación son suficientes para la aceleración de la patología amiloide en el hipocampo inyectado y para su propagación hacia el hipocampo contralateral. Además, en el modelo APP, tras las inyecciones con fracciones solubles, también se produce un aumento en las placas fibrilares en ambos hemisferios, mientras que en el modelo 3xTgAD apenas hay placas de tipo fibrilar. Los escasos depósitos TioS-positivos se concentran en el subículo y apenas sufren cambios como consecuencia de las inyecciones, a excepción de un aumento en el número de placas fibrilares pequeñas. Esto puede deberse a la carga amiloide inicial que existe en el

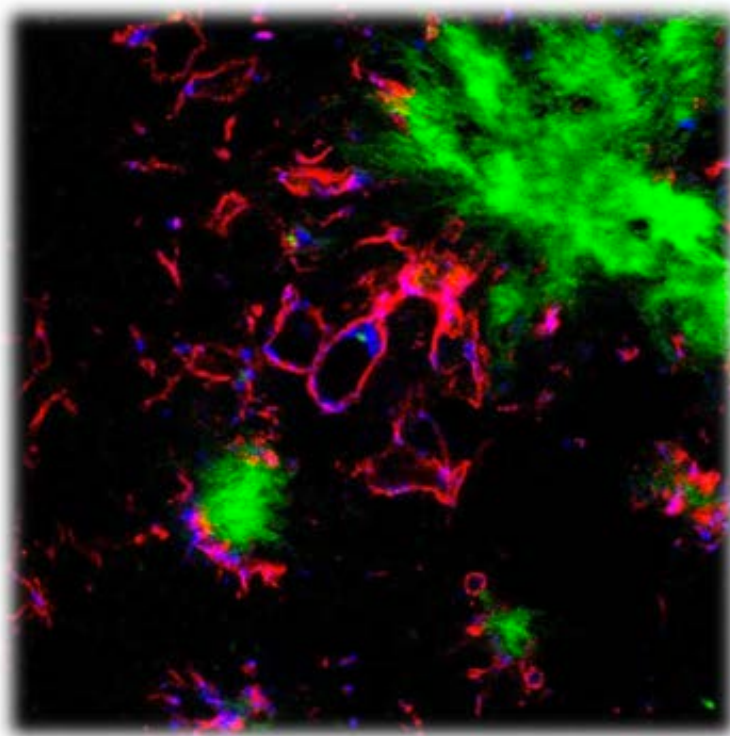
cerebro en el momento de la inoculación. El proceso de nucleación y polimerización dependen de una concentración crítica de semillas presentes. Por debajo de esta concentración, la polimerización es un proceso lento e inestable y no favorecido energéticamente (fase de nucleación). Por encima de esta concentración crítica, la polimerización es más rápida y está favorecida, ya que los intermediarios son más estables (fase exponencial). Por lo tanto, la concentración basal de semillas presentes en el animal en el momento de inoculación, así como la cantidad de proteína sobreexpresada por cada modelo animal que pueda servir como sustrato de conversión pueden influir en la diferente velocidad de aceleración de la propagación. Otro factor que podría estar influyendo en las diferencias obtenidas entre los dos modelos es el tipo de amiloide producido en cada uno de ellos. Es bien sabido que el tipo de animal transgénico que se emplee como receptor influye en los resultados obtenidos según la mutación que posea y, por lo tanto, el tipo de agregados que produzca. No hay que descartar que, además de las diferencias intrínsecas de cada modelo, la concentración y la naturaleza de las semillas que contenía cada una de las fracciones humanas inyectadas en cada experimento pueda ser distinta, influyendo en los resultados observados en cada modelo. Cuando analizamos los animales 3xTgAD sacrificados a edades más avanzadas, tras 10 meses de incubación, observamos diferencias significativas tanto en el hipocampo inyectado como en el contralateral con respecto a los inyectados con PBS. Esto puede ser debido a un mayor tiempo de incubación que permite un mayor grado de agregación, como se ha comentado anteriormente, así como al efecto del envejecimiento en estos animales. Los animales sacrificados 10 meses tras la inoculación tienen 18 meses de edad, lo que se considera envejecido. Se sabe que durante el envejecimiento los sistemas de proteostasis y corrección de proteínas mal plegadas están dañados. Esto, junto a un sistema inmune deteriorado por la edad, puede facilitar una propagación más pronunciada tanto en el hipocampo ipsilateral como en el contralateral.

Los experimentos de propagación usando ratones hA β -KI, un modelo de la forma esporádica de la EA ([Baglietto-Vargas et al. 2019, Nature Comm](#), en revisión), nos permitieron analizar, no sólo la aceleración, sino la inducción de la patología, de forma más fidedigna a lo que ocurriría en el Alzheimer de inicio tardío, donde no existe sobreexpresión de *APP* ni mutaciones en este gen. Este modelo presenta placas amiloides difusas, no fibrilares, que aparecen a partir de los 14 meses en el giro dentado y a los 18 meses en CA1 y subículo. El análisis de los animales inoculados tras 5 meses desde la inyección no mostró ningún tipo de cambio en la agregación de A β , por lo que este periodo de incubación no fue suficiente para que la propagación de las semillas procedentes de la corteza de Braak VI indujera la patología amiloide en el modelo. Sin embargo, sí se observa la presencia de depósitos amiloides difusos tras 10 meses de incubación, a la edad de 18 meses. Aunque se observaron depósitos amiloides en los controles y en el hemisferio no inyectado, la patología amiloide era significativamente mayor en el hipocampo inyectado. Por tanto, un mayor periodo de incubación en un ambiente cerebral envejecido induce la patología a nivel local y en regiones sinápticamente conectadas. Para determinar si esto es específicamente debido al periodo de incubación o a la edad del animal, planeamos realizar estos mismos estudios con el mismo periodo de incubación (10 meses), pero inoculando los animales más jóvenes (2 meses), de forma que estos sean analizados a los 12 meses, cuando aún no existen tantos cambios en el proteasoma y el sistema inmune debidos a la edad avanzada del animal. Queda también por

determinar la influencia de la microglía en la propagación de la patología en regiones distantes.

En resumen, pese a las diferencias encontradas entre los distintos modelos de formas familiares (3xTgAD y APP) y esporádicas de la enfermedad de Alzheimer (hA β -KI), en todos ellos se produce un incremento de la patología amiloide debido a la inoculación de fracciones solubles procedentes del cerebro de pacientes con EA y de modelos amiloidogénicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en otros modelos animales. La inducción y aceleración de la patología amiloide podrían deberse a la presencia de oligómeros solubles que actuarían como semillas competentes para la nucleación en el cerebro de pacientes y modelos, las cuales se propagarían de forma parecida a los priones. Aunque se han propuesto diversos mecanismos para explicar la propagación de estas semillas, aún no está claro cómo se produce, ni si el transporte ocurre de forma selectiva o aleatoria, intracelular o extracelularmente. Se cree que la propagación ocurre de célula a célula, de modo que las proteínas patogénicas serían liberadas por una neurona o célula glial y tomadas por otra neurona/célula glial vecina. Conforme se va transportando a nuevas células, la proteína patológica podría ir induciendo la conversión de proteínas con conformación nativa hacia un plegamiento patológico. Las conexiones neuronales podrían servir de vía de propagación por transferencia sináptica, la cual podría ocurrir de forma anterógrada o retrógrada. La propagación también podría ocurrir por exocitosis de exosomas y lisosomas que contienen A β , tanto por parte de neuronas como de células gliales. El A β extracelular, dentro de vesículas o desnudo, puede ser fagocitado por la glía. La glía también puede internalizar terminales sinápticos que contienen agregados y propagarlos entre distintos tipos celulares. El transporte de célula a célula también podría ocurrir a través de nanotubos (*tunneling nanotubes*) que comunican el citoplasma de dos células de forma transitoria. A través de ellos pueden transportarse orgánulos como lisosomas y mitocondrias, pero también virus y priones asociados a lisosomas/endosomas. Los nanotubos entre neuronas también parecen servir para el transporte de A β , aunque no se sabe si de forma asociada a lisosomas o no. Otra posibilidad sería la difusión pasiva de los agregados a través del espacio extracelular (Brettschneider et al. 2015; Eisele and Duyckaerts 2016; Victoria and Zurzolo 2017). No hay que descartar que el transporte de las semillas ocurriera por varios mecanismos combinados. Es necesario elucidar los mecanismos implicados en la propagación de proteínas amiloides para entender mejor cómo ocurre la propagación de la patología e identificar dianas terapéuticas que permitan frenar su desarrollo.

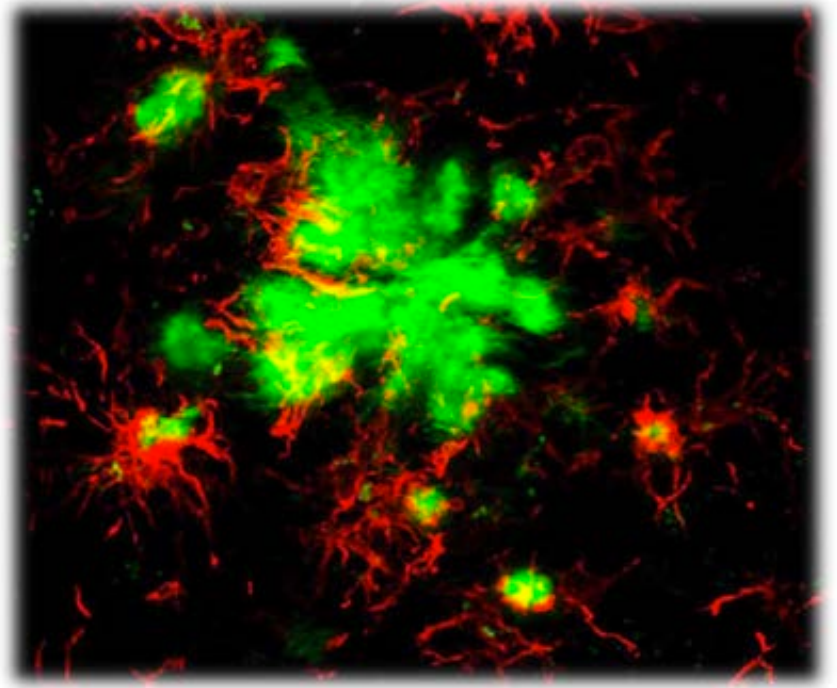
5. Conclusiones



1. En el hipocampo del modelo APP/PS1 se forman placas neuríticas similares a las que desarrollan los pacientes de Alzheimer, con un core fibrilar rodeado de un halo tóxico de A β oligomérico. Con el avance de la enfermedad las placas aumentan en tamaño adquiriendo mayor toxicidad. Una diferente reactividad de las placas podría determinar la progresión hacia la fase clínica o, por el contrario, la resiliencia a la enfermedad. Por tanto, la opción de modular las propiedades tóxicas de las placas merece ser explorada como estrategia terapéutica.
2. Las placas amiloides están rodeadas por microglía activada, caracterizada a nivel transcriptómico por la firma molecular DAM (microglía asociada a enfermedad). La respuesta microglial incrementa en paralelo con la patología amiloide, sin embargo, se satura a edades avanzadas no respondiendo a la acumulación continuada de A β . Esto podría indicar que existe agotamiento funcional, senescencia o degeneración microglial en fases avanzadas de la patología, al igual que ocurre en el hipocampo de los pacientes con Alzheimer.
3. La microglía activada que rodea las placas muestra diversos subtipos morfofuncionales con potencial de modular la patología amiloide y proteger el parénquima nervioso mediante la fagocitosis de A β , la compactación y/o el aislamiento de las placas. Las evidencias ultraestructurales sugieren un papel relevante de la microglía en la formación de las placas generando fibrillas amiloides, como mecanismo protector para retirar el A β soluble tóxico del medio. Por tanto, la activación microglial periplaca es una respuesta inmune cerebral beneficiosa dirigida a neutralizar la toxicidad del A β .
4. Esta función protectora de la microglía periplaca disminuye en fases avanzadas de la patología como consecuencia de un proceso de disfunción o degeneración de estas células activadas. Por tanto, la idea de restaurar la función microglial o bien potenciar la renovación de esta población debería ser considerada a nivel terapéutico para reducir el efecto tóxico de las placas y el daño neuronal en la enfermedad de Alzheimer.
5. El A β soluble derivado de pacientes de Alzheimer y de modelos amiloidogénicos actúa como semilla propagando *in vivo* la patología amiloide en modelos de las formas familiares y esporádica de la enfermedad. Los datos en el modelo APP/PS1 sugieren que la microglía podría ser un vector para la propagación no sináptica de la patología amiloide, siendo esta población glial una potencial y novedosa diana terapéutica para frenar la diseminación de A β hacia otras regiones cerebrales.

1. In the APP/PS1 hippocampus, neuritic plaques are generated similar to those developed by Alzheimer's patients, with a fibrillar core surrounded by a toxic oligomeric A β halo. With the progression of the disease, plaques increase in size and toxicity. A different reactivity of the plaques could determine the progression towards the clinical phase or, on the contrary, the resilience to the disease. Therefore, the option of modulating the toxic properties of amyloid plaques deserves to be explored as a therapeutic strategy.
2. Amyloid plaques are surrounded by activated microglia, which are characterized at the transcriptomic level by the DAM (disease-associated microglia) molecular signature. The microglial response increases in parallel with the amyloid pathology, however, it become saturated at advanced ages not responding to the continuous A β accumulation. This could indicate that there is functional exhaustion, senescence or microglial degeneration in advanced stages of the pathology, as occurs in the hippocampus of Alzheimer's patients.
3. The activated microglia surrounding plaques show diverse morpho-functional subtypes with the potential to modulate the amyloid pathology and protect the brain parenchyma by A β phagocytosis, compaction and/or plaque isolation. The ultrastructural evidences suggest a relevant role of microglia in the formation of plaques generating amyloid fibrils, as a protective mechanism to remove toxic soluble A β from the environment. Therefore, peri-plaque microglial activation is a beneficial brain immune response aimed to neutralize A β toxicity.
4. This protective function of peri-plaque microglia decreases in advanced stages of the pathology as a result of a dysfunctional or degenerative process of these activated cells. Therefore, the idea of restoring microglial function or enhancing the renewal of this population should be considered at the therapeutic level to reduce the toxic effect of plaques and neuronal damage in Alzheimer's disease.
5. Soluble A β derived from Alzheimer's patients and from amyloidogenic models acts as a seed spreading *in vivo* the amyloid pathology in models of the familial and sporadic forms of the disease. The data in the APP/PS1 model suggest that the microglia could be a vector for the non-synaptic propagation of amyloid pathology, supporting this glial population as a potential and novel therapeutic target to stop the spread of A β to other cerebral regions.

6. *Summary*



PhD Thesis - 2019

CHARACTERIZATION OF THE AMYLOID PATHOLOGY AND ITS RELATIONSHIP WITH MICROGLIAL CELLS IN THE HIPPOCAMPUS OF TRANSGENIC ANIMAL MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Author (PhD Student):

Cristina Núñez Díaz

Bachelor in Biology

MS in Cellular and Molecular Biology

PhD Supervisors:

Dr. Antonia Gutiérrez. Full Professor of Cell Biology at University of Malaga

Dr. Javier Vitorica. Full Professor of Biochemistry at University of Seville

Laboratory Address:

Department of Cell Biology, Genetics and Physiology (Cell Biology Area). Faculty of Sciences.
University of Malaga. Campus Teatinos, 29071. Malaga, Spain

Contact Information:

Cristina Núñez Díaz

Email: cristinand@uma.es

Phone: +34 952131935

Dr. Antonia Gutiérrez

Email: agutierrez@uma.es

Phone: +34 952133344

Dr. Javier Vitorica

Email: vitorica@us.es

Phone: +34 954556770

Grants Support:

This PhD work was supported by grants PI15/00796 (to AG), PI15/00957 (to JV), PI18/01557 (to AG) and PI18/01556 (to JV) from Instituto Salud Carlos III co-financed with FEDER funds from European Union, by grant CTS-2035 from Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo-Proyecto Excelencia Junta Andalucía (to JV and AG), by PAIDI group CTS-950 from Junta de Andalucía, and by CIBERNED from Instituto Salud Carlos III, Spain. Cristina Núñez-Díaz was sponsored by a PhD fellowship from Junta de Andalucía.

Publications in peer-reviewed journals:

Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Diaz C, Trujillo-Estrada L, Davila JC, Vizuite M, Gutierrez A, Vitorica J. *Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration*. **Acta Neuropathologica** 2016 132(6):897-916. doi: 10.1007/s00401-016-1630-5

Impact factor: 18.17

Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L, Fernandez-Valenzuela JJ, Vizuite M, Comella JX, Galea E, Vitorica J and Gutierrez A. (2017). *Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease*. **Glia** 2018 66(3):637-653. doi: 10.1002/glia.23270.

Impact factor: 6.2

Sanchez-Mejias E*, Nuñez-Diaz C*, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Davila JC, Vitorica J, Gutierrez A. *Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients*. **Brain Pathology** 2019 Sep 6. doi: 10.1111/bpa.12785. *Both first authors.

Impact factor: 6.62

Baglietto-Vargas D, Cai L, Martini AC, Trujillo-Estrada L, Forner S, Swarup V, Thu Nguyen MM, Huynh KD, Jiang S, Kramár EA, Nuñez-Diaz C, Balderrama-Gutierrez G, Garcia F, Childs J, Rodriguez-Ortiz CJ, Kitazawa M, Shahnawaz M, Matheos DP, Ma X, Cunha CD, Walls KC, Ager RR, Soto C, Gutierrez A, Moreno-Gonzalez I, MacGregor GR, Green KN, Wood MA, Mortazavi A, Tenner AJ, LaFerla FM. *Humanized A β mice develop age-related impairments in LTP, cognition, and pathology: a basis to model late-onset Alzheimer's disease*. **Nature Communications** 2019 (under 2nd revision).

Impact factor: 11.88

Book Chapter

Nuñez-Diaz C, Vitorica J y Gutierrez A. *Toxicidad de las placas amiloides y su impacto en la progresión de la enfermedad de Alzheimer*. Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and other Diseases. 2018 pp 195-207. UMA Editorial. ISBN 978-84-17449-55-1

In addition, this thesis contains unpublished data.

6.1. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, with an increasing number of people affected due to population ageing. So far there is no cure for this devastating neurodegenerative disease. AD brains display the accumulation of amyloid-beta peptide (A β) and hyperphosphorylated-Tau (phospho-Tau), which aggregate giving rise to extracellular amyloid plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles, respectively. The accumulation of A β in amyloid plaques is the first pathological event, starting up to 20 years before the onset of the symptoms, and it is believed to be the causative agent of the disease, spreading in the brain in a prion-like manner. Amyloid pathology, caused by the accumulation of A β , is believed to be a prion-like disease. Similar to prions, misfolded A β can act as a seed and induce an alternative conformation in native A β , contributing to the propagation of the pathology. However, the mechanisms by which misfolded A β spread in the brain are not fully understood. Amyloid pathology has long dominated the therapeutic landscape, however, to date all drug trials have failed. Moreover, no correlation between amyloid pathology and cognitive impairment exists, with some people bearing substantial amount of plaques with no cognitive impairment. Altogether, this supports the existence of additional pathogenic mechanisms non identified yet.

The accumulation of A β and phospho-Tau is accompanied by chronic inflammation, with the activation of microglial and astroglial cells, however, the mechanisms that trigger the onset and progression of the pathology are not known. Microglial cells have recently been the research target, since many genes related with the risk for developing AD are expressed by microglia. Therefore, these cells seem to be determinant in the development of late-onset AD. Nevertheless, the function(s) of microglia in the progression of amyloid pathology is not clear yet. Evidence suggests that activated microglia may display both neuroprotective and neurotoxic phenotypes and this may change with the disease progression. In response to A β , microglia is activated and migrates to plaques showing a specific transcriptional profile named disease-associated microglia (DAM). DAM microglia around plaques could have protective functions, such as phagocytosis of A β and plaque compaction/isolation. However, they can also release proinflammatory cytokines, contributing to synaptic loss and neurodegeneration. All of the above points to the necessity of elucidating the roles of microglia around plaques. Besides, our group has recently reported in the hippocampus of AD patients a significant microglial degenerative process with the progression of the pathology. It is not known if this process also occurs in amyloidogenic AD models which display stronger microglial activation compared to humans.

Here we propose that the progression of the amyloid pathology is associated with a dysfunctional/degenerative process of the activated microglial cells that surround amyloid plaques. As disease progresses and microglia degenerate, plaques become less efficiently isolated and, in consequence, oligomeric A β peptides are released leading to synaptic and neuronal damage, and the spread of the pathology through the induction of conformational changes in native A β . The general objective of this PhD Thesis is to characterize, at the molecular, cellular and subcellular level, the morphological and functional phenotypes of activated microglia, its relationship with the progression of the amyloid pathology and the

disease-dependent changes. For this, the APP_{750SL}/PS1_{M146L} transgenic model has been studied. We also analyzed the effect of the inoculation of soluble fractions from AD patients and an amyloidogenic model in the propagation of amyloid pathology in different animal models, both for the familial (APP_{SL}, 3xTgAD) and the sporadic (hA β -KI) form of Alzheimer's disease. We also tested a possible formation of *de novo* plaques in WT mice after injection of A β seeds from AD patients and an amyloidogenic model.

Our results show a tight relationship between amyloid pathology and microglial activation in the APP/PS1 hippocampus. However, the microglial response seems to be saturated at advanced age although the amyloid load continues to increase significantly. This could indicate that microglial cells are unable to maintain their activated state as a result of their long and chronic response (they are a long-lived cell population) and/or a decrease in the microglial turnover with age. Our transcriptomic analysis revealed disease-dependent increase in DAM gene expression in APP isolated microglia. Some of the upregulated DAM genes are also risk factors for developing AD, such as *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP* and *APOE*. This is a strong evidence that microglia is involved in the pathogenesis of AD. The cellular and ultrastructural analyses showed the existence of different microglial functional subtypes. Phagocytic microglia were involved in A β and dystrophic neurites clearance, though this process appeared to be impaired. It is possible that chronic microglial activation causes deterioration of the intracellular degradation compartments leading to a dysfunctional phagocytic phenotype which is supported by the identification of plaque-associated dark microglia at electron microscopy. A relevant finding was the presence of amyloid fibers within microglial cytoplasm which support a role for microglia in the formation of amyloid plaques. The formation of plaques could be a protective mechanism to remove toxic soluble A β from the parenchyma. Activated microglia can also participate in the aggregation/compaction of plaques, which could prevent the release of A β and the neuronal damage. Secretion of galectin 3 and/or the inflammatory ASC specks by activated microglia could drive this process. Activated microglia expressing TREM2 form a barrier around plaques and we found a decrease in this microglial envelop with disease progression. Besides, a subset of plaque-associated microglial cells expressed ferritin, a senescent marker, and showed degenerative morphology including dystrophies and abnormal mitochondria. The number of these degenerating microglial cells increased with disease progression. Finally, we found that the inoculation of soluble fractions from AD patients and amyloidogenic models, containing A β seeds, induced an increment in amyloid pathology in the brain of familial and sporadic AD models. We also found differences in the propagation of A β seeds which depended on the concentration and characteristics of the seeds present in the inoculum, the nature of the A β present in the host, the age of the host and the time of incubation after the injection of the inoculum.

To date, the classical view of cytotoxic microglial activation in response to the accumulation of A β has dominated AD research; however the latest advances in this field and the results of this Doctoral Thesis point to a protective role of plaque-associated activated microglia as a CNS response aimed at controlling amyloid pathology. However, these cells become dysfunctional, senescent or degenerative as disease progresses, so the idea of restoring microglial function or renewing this population should be considered as potential therapy for AD.

6.2. LITERATURE OUTLINE

6.2.1. ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative proteinopathy and the most common form of dementia among elderly people (Long and Holtzman 2019). It is estimated that more than 47 million people in the world are affected by dementia. The global burden of AD is expected to increase further owing to population ageing. Clinical AD dementia cannot be definitively diagnosed until *post mortem* neuropathologic evaluation (Tatarnikova et al. 2015; Scheltens et al. 2016; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018). The major pathology feature of this disease is the accumulation of misfolded proteins: the amyloid-beta ($A\beta$) which forms extracellular plaques (senile plaques), and the hyperphosphorylated Tau protein (phospho-Tau) which gives rise to intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs) (Perl 2010; Masters et al. 2015; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018). Although these two protein lesions were described over a century ago by Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907), their link to brain degeneration remain elusive. Existing data support oligomeric species of $A\beta$ and Tau propagation and spreading within neural circuits. Undefined are the mechanisms by which these events are initiated and sustained, the structure of $A\beta$ species responsible, and the importance of spread and propagation for AD pathogenesis.

The abnormal protein accumulation in AD brains is accompanied by a neuroinflammatory process, synaptic loss and neuronal death. The precise role of $A\beta$ in AD pathology remains an open question as $A\beta$ plaques may accumulate up to 20 years before any observable AD symptoms or diagnosis during the asymptomatic preclinical phase. AD can be either familial or sporadic. Early onset familial AD (FAD) is caused by mutations in amyloid precursor protein (*APP*), presenilin 1 (*PSEN1*) or presenilin 2 (*PSEN2*) genes. These familial forms of AD account for less than 1% of the cases (Calero et al. 2015; Sasaguri et al. 2017; Shi and Holtzman 2018; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018). More common late onset AD (LOAD) is considered sporadic, although genetic risk factors have been identified, most notably apolipoprotein E gene (*APOE*). Age, family history in a first degree relative, and *APOE4* genotype confer the greatest risks of developing AD. Other risk factors for LOAD, including *TREM2*, *ADAM10* and *PLD3*, have been identified using genome wide association studies (GWAS) to implicate nearly 30 genes that not only affect *APP* and Tau directly but also modulate cholesterol metabolism, endocytosis and immune response, among those with known functions. Understanding the role of these and newly identified risk factors should provide insight into mechanisms that drive Alzheimer's pathogenesis (Giri et al. 2016; Calero et al. 2015; Sasaguri et al. 2017; Shi and Holtzman 2018). At present there is no cure for Alzheimer's disease and existing treatments for AD produce only a modest amelioration of symptoms. Studies of pathogenesis are essential for defining targets for discovering disease-modifying treatments.

6.2.2. $A\beta$ AND THE AMYLOID CASCADE HYPOTHESIS

The amyloid- β ($A\beta$) peptides are proteolytic fragments derived from *APP*, which is an integral membrane protein. The human *APP* gene is located on the long arm of the chromosome 21, and alternative splicing can produce various *APP* mRNAs encoding several

isoforms. The most common APP species in the brain is APP695, and it is produced mainly by neurons (Kang and Müller-Hill 1990; Goate et al. 1991; Rohan de Silva et al. 1997; Turner et al. 2003; Arbor et al. 2016). Normal processing of the APP sequence consists of non-amyloidogenic proteolysis via α -secretase and γ -secretase, producing soluble fragments. However, when APP is cleaved by β -secretase and γ -secretase (amyloidogenic proteolysis) leads to insoluble A β peptides that aggregate in the brain to form amyloid plaques. A β is a peptide consists of 37–43 amino acids, in which the isoforms 1–40 and 1–42 are the most common. The A β 1–42 peptide isoform is the most hydrophobic and is considered to have the greatest toxicity. Concentrations of A β peptide are determined by the balance between generation and clearance; in AD patients, a clearance abnormality leads to the accumulation of A β in the brain (Zerbinatti et al. 2004; Liu et al. 2014; Eggert 2017). The amyloid cascade hypothesis was first posited in 1992 (Hardy and Higgins 1992), which postulates that the accumulation of A β peptides initiates the pathogenesis of AD, leading to neurofibrillary tangles and neurodegeneration that cause memory loss (Hardy and Selkoe 2002). A huge body of evidence has accumulated over these last 25 years showing that different forms of A β , from insoluble aggregates to soluble dimers/oligomers, either synthetic or derived from AD brains, can cause synaptotoxic effects and neuronal death. However, with respect to the original premise, soluble A β peptides, rather than their insoluble fibrillar aggregates, are now thought to be the main responsible agents as they seem to better correlate with AD symptoms and severity (Sakono and Zako 2010; Forner et al. 2017). Thus, A β peptides have long been viewed as a potential target for AD which dominated new drug research during the past twenty years. Hundreds of drugs developed based on the amyloid cascade hypothesis have been tested in Alzheimer's disease clinical trials; however, all attempts to develop A β -targeting drugs to treat AD have ended in failure. This suggests the existence of alternative mechanisms for AD pathogenesis that need to be discovered. AD is a multifactorial complex disease, and a more integrated approach must be applied to increase treatment efficacy (Makin 2018; Yuksel and Tacal 2019).

6.2.3. AMYLOID PLAQUES

The extracellular accumulation of A β peptides, and their aggregation and deposition in amyloid plaques, is believed to be a key pathogenic mechanism in AD (Yuksel and Tacal 2019). Amyloid plaques are commonly classified in diffuse and dense-core based on their morphology and positive or negative staining with Thioflavin-S or Congo Red (Eisele and Duyckaerts 2016; Perl 2010; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2018):

- *Dense-core plaques* are fibrillar amyloid deposits with compact core that stains with Thioflavin-S and Congo Red. Dense-core plaques are typically surrounded by dystrophic neurites (neuritic plaques), reactive astrocytes and activated microglial cells, and associated with synaptic loss. The presence of neuritic plaques is used for the pathological diagnosis of AD because there are generally associated with cognitive impairment.
- *Diffuse plaques* are amorphous amyloid deposits with ill-defined contours that are Congo Red and Thioflavin-S negative. Diffuse plaques are usually non-neuritic and not associated with glial responses or synaptic loss. This plaque type is not considered for the pathological

diagnosis of AD because it is a relatively common finding in the brain of cognitively intact elderly people.

Amyloid plaques appear to progress through stages, beginning with diffuse accumulation of extracellular A β followed by maturation to more dense deposits associated with a corona of dystrophic neurites. Recent advances in amyloid imaging have made it possible to observe A β amyloid accumulation in the patient's brain. As a result, it has been found that there are a large number of people without cognitive impairment with substantial accumulation of plaques in their brains, and also demented AD patients with very few amyloid deposits (Esparza et al. 2013; Hong et al. 2014).

6.2.4. MICROGLIA AND INFLAMMATION IN ALZHEIMER'S DISEASE

Reactive gliosis and neuroinflammation are hallmarks of AD. In addition to A β plaques and NFTs, the brains of patients with AD exhibit evidence of a sustained inflammatory response. Brain inflammation appears to have a dual function, playing a neuroprotective role during an acute-phase response, but becoming detrimental when a chronic response is mounted (Heneka et al. 2015; Mcmanus and Heneka 2017; Sochocka et al. 2017). Microglia-related pathways are considered to be central to AD risk and pathogenesis, as supported by emerging genetic and transcriptomic studies. In this sense, a cluster of genes associated with the risk of sporadic AD (including *CD33*, *CR1*, *MS4A6A*, *MS4A4E*, *ABCA7* and *TREM2*) encode proteins that are involved in innate immunity and microglial function (Calero et al. 2015; Zhao et al. 2018b; Sierra et al. 2019).

Microglia are the resident immune cells within the central nervous system (CNS). In a healthy brain, microglia are in a homeostatic state and are described morphologically as ramified cells. In this state, cell processes extend and retract surveying their environment. When microglia recognize a threat, such as invasion, injury, or disease, it leads to microglial activation, causing a morphological change resulting in retraction of processes and enlargement of the cell body (Li and Barres 2018; Abbott 2018; Song and Colonna 2018; Hansen et al. 2018). In AD, activated microglia respond to A β , resulting in migration to the plaques and phagocytosis of A β . The classical view stated that prolonged activation of the immune response result in an exacerbation of AD pathology. This results in an accumulation of A β and sustained pro-inflammatory cytokine production beginning to damage neurons (Venegas et al. 2017; Hansen et al. 2018; Webers et al. 2019). Targeting these aberrant microglial functions and thereby returning homeostasis may yield novel paradigms for AD therapies. However, given the complexity and diverse functions of microglia in health and disease, there is a crucial need to dissect microglial functional subpopulations. Microglial functional states are evolving, and microglia associated with AD lesions do not fit neatly into the traditional M1 or M2 classification. In the AD environment, the role of microglial cells may be both neuroprotective and neurotoxic, the balance between which may change over time in a single individual (Colonna and Butovsky 2017). Elucidating the different functional states of microglia, which may exist at different stages of AD or coexist in the same stage, is crucial to understanding the role of microglia in neurodegeneration. Transcriptomic profiles of microglia identified a novel disease-associated microglial (DAM) state in which expression of "homeostatic" gene signature is reduced (e.g., *CX3CR1*, *P2RY12*, and *TMEM119*) and another

“neurodegeneration” gene signature is highly induced (e.g., *APOE*, *AXL*, *CSF1*, *CLEC7A*, *CST7*, *IGF1*, *TREM2*). The DAM profile highlights a key role for lysosomal, phagocytosis, lipid metabolism, and immune response pathways in AD pathogenesis (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017; Hansen et al. 2018). Within the different AD-associated genes, the microglial triggering receptor expressed in myeloid cells 2 (*TREM2*) gene seems to perform a pivotal role in the AD-associated immune response. *TREM2* is a lipid and lipoprotein sensor that, through its adapter molecule *DAP12*, supports reactive microgliosis. Furthermore, it has been recently demonstrated that *TREM2*, interacting with *APOE* (the major genetic risk factor for AD), regulates the transcriptional activation of microglial cells (Krasemann et al. 2017). However, the role of *TREM2*-mediated microglial activation, or even the function of the microglial cells in the pathology of AD, is not elucidated (Ulrich et al. 2017).

A better understanding of the pathogenic mechanisms underlying AD is needed to facilitate success for clinical interventions. In recent years, a novel pathogenic component is gaining strength in the onset and progression of this disease, the neuroinflammatory response mediated primarily by the brain's resident immune cells, microglia. Our current concept, mostly derived from A β producing transgenic models which show a robust microglial activation, supports an initially beneficial role of these glial cells followed by a pro-inflammatory cytotoxic function later on. This view is now challenged by emerging data in human *post mortem* samples. In this sense, we have recently demonstrated that in the hippocampus of AD patients there is a prominent degenerative process of the microglial population, driven by phospho-Tau, that might compromise neuronal homeostasis (Sanchez-Mejias et al. 2016; Navarro et al. 2018; Gutierrez and Vitorica 2018). Therefore, a deficient rather than an exacerbated microglial response could be implicated in the development of sporadic AD.

6.2.5. AIMS OF THE STUDY

Amyloid plaques induce a strong microglial activation around them. However, little is known about the relationship of activated microglia and amyloid pathology as disease progresses. It is not known whether the microglia act simply as an insulating agent or if it is actively involved in the formation/compaction of plaques regulating their toxic capacity (reducing/increasing the release of oligomers). It is also not known if there are different phenotypes of activated microglia around the plaques or if they suffer a degeneration process with the progression of the pathology.

Considering all the above, our working hypothesis proposes that *the progression of amyloid pathology is associated with a dysfunctional/degenerative process of the activated microglia surrounding plaques as disease progresses. Microglia degeneration results in an ineffective plaque isolation which, in turn, increases the release of soluble oligomers to the cerebral parenchyma producing axonal/synaptic damage and neuronal death, and, in addition, contributing to spread the amyloid pathology.*

The general objective of this Doctoral Thesis is to characterize, mainly at the cellular and ultrastructural level, the morphological and functional changes of plaque-associated

microglia as the disease progresses and determine their interaction with the progression of the amyloid pathology in the hippocampus of the transgenic APP/PS1 model. The specific objectives are the following:

Objective 1. To characterize the temporal evolution of extracellular amyloid pathology in the hippocampus of an APP/PS1 amyloidogenic model from 4 to 18 months of age.

- ✓ 1.1. To determine changes in plaque morphology and toxicity with the progression of the disease. For this, parameters such as size, oligomeric halo and the neuritic pathology associated with these plaques in animals 4, 6, 12 and 18 months of age will be studied. Histological and immunohistochemical techniques will be used with conventional optical, confocal and electron microscopy, as well as stereological and image analysis techniques.
- ✓ 1.2. To analyze the metabolic alterations during the progression of amyloid pathology and the neurodegenerative process. The hippocampal metabolomic profile of APP/PS1 and WT animals at 6 and 12 months of age will be analyzed in collaboration with the Nanoimaging Unit at Bionand (Málaga).

Objective 2. To study the interaction of the activated microglia with amyloid plaques as disease progresses in the hippocampus of the APP/PS1 amyloidogenic model.

- ✓ 2.1. To determine disease progression-dependent changes in the microglial gene profile by transcriptomic analysis of isolated microglia from transgenic mice at initial and advanced stages of the disease.
- ✓ 2.2. To characterize at the cellular and subcellular level the microglial phenotypes, the interaction between activated microglia and amyloid plaques, and potential microglial degenerative changes in the hippocampus of transgenic mice from 4 to 18 months of age. Conventional optical microscopy, confocal and electronic microscopy studies, in combination with immunolabeling and image analysis will be carried out.

Objective 3. To determine the effect on amyloid pathology of intracerebral inoculation of soluble brain fractions (S1) derived from APP/PS1 animals and Alzheimer's patients (Braak V-VI): A β seeding *in vivo* studies in models of the genetic and sporadic forms of the disease.

S1 fractions of amyloidogenic models containing soluble forms of A β , and in the case of human brains also hyperphosphorylated Tau, will be inoculated by stereotaxic injections into the brains of wild-type mice and various amyloidogenic models, both of the familial (APP751SL and 3xTgAD) and sporadic (hA β -KI) forms of the disease. The effect of S1 fractions will be analyzed by *in vivo* behavioral tests, immunohistochemistry, stereological techniques and image analysis. Part of this objective has been carried out during a research stay in the laboratory of Dr. Frank M. LaFerla at the University of California, Irvine (United States).

6.3. MATERIAL AND METHODS

6.3.1. TRANSGENIC MICE

Male transgenic APP (APP751Swe-London) mice (C57BL:6 background) of 4 months of age, and APP/PS1 (APP751Swe-London/PS1M146L) mice of the same background of 4, 6, 12 and 18 months of age were used (Blanchard et al. 2003). The APP/PS1 transgenic model has been previously characterized (Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014; Gomez-Arboledas et al. 2017). Age-matched non-transgenic mice or wild type (WT) (C57BL:6 background) were used as controls. All animal experiments were carried out in accordance with the Spanish and the European Union regulations (RD53/2013 and 2010/63/UE), and with the approval of the committee of Animal Research from the University of Malaga (Spain).

Male transgenic 3xTgAD (PS1M146V/APPSwe/TauP301L) mice (C57BL:6 background) were used (Oddo et al. 2003) and the novel hA β -KI mice (humanized A β peptide-coding sequence in the mouse *amyloid precursor protein* (*App*) gene was used to generate this non-mutant human A β knock-in). The hA β -KI mice (official strain name B6(SJL)-*App*^{tm1.1Aduci}/J) were generated by Dr. LaFerla's group from University of California at Irvine (UCI, USA) and they are now available from The Jackson Laboratory (JAX Stock No. 030898, <http://jaxmice.jax.org/strain/005304.html>). Age-matched non-transgenic mice (WT, C57BL:6 background) were used as controls. All animal procedures were performed in accordance with National Institutes of Health and University of California, Irvine Animal Care and Use Committee.

6.3.2. HUMAN SAMPLES

Human autopsy specimens from the medial temporal lobe (hippocampal region) were obtained from the Neurological Tissue Bank of IDIBELL-Hospital of Bellvitge (Barcelona, Spain). Samples included aged and cognitively normal subjects with early tau pathology (Braak II, n=3) and demented AD patients (Braak V-VI, n=3). The utilization of *post mortem* human samples was approved by the corresponding biobank ethics committees following Spanish legislation. All cases were scored for Braak tau pathology as we previously summarized (see Sanchez-Mejias et al. 2016). A *post mortem* frontal cortex sample (Braak V-VI, n=1), provided by the Alzheimer's Disease Research Center at UCI (ADRC-UCI) was also used, following the National Institute of Health (NIH) legislation.

6.3.3. REGION OF STUDY: HIPOCAMPUS

The hippocampus is a horn-like paired structure, located inside the medial temporal lobe, beneath the cortical surface. It belongs to the limbic system and plays important roles in the consolidation of information from short-term memory to long-term memory and spatial navigation. The hippocampus accumulates amyloid plaques since early stages of AD (Braak and Braak 1991; Andersen 2007) as also occurs in temporal neocortex and the entorhinal cortex.

The hippocampal formation involves the subiculum, the hippocampus proper (HP) and the dentate gyrus (DG). The subiculum continues laterally with the parahippocampal cortex. The mice hippocampus can be found from Bregma -0.94 mm to Bregma -4.04 mm in the histology atlas (Franklin and Paxinos 2008). The hippocampus is medially bordered by the fimbria-fornix. At rostral levels, it appears dorsally, after septum, inferior to the corpus callosum, superior to the dorsal thalamus and dorso-laterally bordered by the parietal cortex. The hippocampus bends caudo-ventrally (temporal pole), and it is situated close to the amygdaloid complex. Its lateral boundaries are defined by the entorhinal and perirhinal cortex, among others. Moreover, the HP can be divided into four regions, called CA1 to CA4 (CA meaning *Cornu Ammonis*). CA1 area is localized between the subiculum and the hippocampus while CA2 and CA3 are inside the hippocampus. CA4 is practically indistinguishable in mice hippocampal formation (Andersen 2007).

6.3.4. TISSUE PREPARATION

Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) and transcardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), followed by 4% paraformaldehyde, 75mM lysine, 10mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB). Fixed and cryoprotected brains were sectioned at 40 μ m thickness in the coronal plane on a freezing microtome and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide. For light microscopy studies, human samples were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected and sectioned at 30 μ m thickness on a freezing microtome.

6.3.5. THIOFLAVIN-S AND CONGO RED STAININGS

Free-floating sections were incubated for 5 minutes with 0.02% Thioflavin-S in 50% ethanol, and then washed in 50% ethanol and PBS, mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped with 0.01 M PBS containing 50% glycerine and 2.5% triethylenediamine. For Congo red staining, sections were incubated for 3 minutes with 20% Congo red in 100% ethanol with NaCl 0.03%, and then washed in PBS. Tissue was finally mounted on gelatine-coated slides, air-dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX mounting medium.

6.3.6. LIGHT MICROSCOPY IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Serial sections from control and transgenic mice were assayed simultaneously for light and confocal microscopy immunostaining using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions as previously reported (Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008).

Antigen retrieval method (80°C in 50 mM citrate buffer, 85% formic acid or 0.2% triton-X in PBS) was first performed (when needed), and free-floating sections were then treated with 3% H₂O₂/10% methanol in PBS to inhibit endogenous peroxidase followed by avidin-biotin Blocking Kit to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. For single immunolabeling, sections were incubated overnight at room temperature with one of the following primary antibodies: anti-A β 1-40 rabbit polyclonal (1:1000, Millipore); anti-A β 1-

42 rabbit polyclonal (1:5000, Abcam); anti-oligomeric A β (OC) rabbit polyclonal (1:5000, Millipore); anti-A β 1-17 (6E10 clone) mouse monoclonal (1:5000, Covance); anti-A β 17-24 (4G8 clone) mouse monoclonal (1:2000, Biolegend); anti-A β 1-12 (BAM10 clone) mouse monoclonal (1:2000, Covance); anti-ASC rabbit polyclonal (1:1000, Adipogen); anti-APP-C-term goat polyclonal (1:200000, Meridian Life Sciences); anti-CD68 rabbit polyclonal (1:1000, Abcam); anti-CD45 rat polyclonal (1:500, AbD Serotec); anti-EAAT2 rabbit polyclonal (1:10000 Abcam); anti-Ferritin rabbit polyclonal (1:10000, Sigma); anti-Galectin3 goat polyclonal (1:5000, R&D); anti-GFAP rabbit polyclonal (1:10000, Dako); anti-GFAP chicken polyclonal (1:20000, Millipore); anti-Iba1 goat polyclonal (1:2000, Abcam); anti-Iba1 rabbit polyclonal (1:1000, Wako); anti-LAMP1 rat polyclonal (1:500, Sigma); anti-Olig2 mouse polyclonal (1:5000, DHSB); anti-PHF-Tau (AT8 clone) mouse monoclonal (1:1000, Termofisher); anti-PHF-Tau (AT100 clone) mouse monoclonal (1:1000, Termofisher); anti-PHF-Tau (PHF1) mouse monoclonal (1:1000, gift by Dr. Peter Davies); and anti-Trem2 sheep polyclonal (1:1000, R&D). The tissue-bound primary antibody was detected by the incubation for 70 min with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500, Vector Laboratories), followed by incubation with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:2000, Sigma) for 90 min, and finally visualized with 0.02 % 3-3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich), 0.01% hydrogen peroxide in PBS and 0.03% nickel ammonium sulphate. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double DAB/nickel-DAB immunohistochemical labeling sections were first incubated with the first primary antibody as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were then incubated with the second primary antibody. The second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end product).

For double or triple immunofluorescence labeling, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa Fluor[®]488/568 or Cy5[®] secondary antibodies (1:1000, Invitrogen). Sections were examined under a confocal laser microscope (Leica SP8).

6.3.7. TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM)

For transmission electron microscopy (TEM), fixed brains were sectioned at 50 μ m or 250 μ m thicknesses in the coronal plane on a vibratome (Leica VT1000S) and serially collected in wells containing cold PB and 0.02% sodium azide. For standard electron microscopy, the 250 μ m-thick sections were postfixated in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB, block stained with uranyl acetate, dehydrated in acetone, and flat embedded in Araldite. Selected areas were cut in ultrathin sections and examined with an electron microscope (JEOL JEM1400).

For the immunogold labeling, 50- μ m thick sections were cryoprotected in a 25% sucrose and 10% glycerol solution, followed by freezing at -80°C in order to increase the antibody binding efficiency. Sections were then incubated 48h in primary antibody in a PBS 0.1M/0.1% sodium azide/2% BSA-solution at 22°C. The tissue-bound primary antibody was detected by the incubation with the corresponding 1.4 nm gold-conjugated secondary antibody (1:100, Nanoprobes) overnight at 22°C. After postfixation with 2% glutaraldehyde

and washing with 50 mM sodium citrate, the labelling was enhanced with the HQ Silver™ Kit (Nanoprobes), and gold toned. Finally, the immunolabeled sections were processed as we previously described by the osmium fixation, dehydration and embedding steps. The primary antibody was omitted in negative control experiments.

6.3.8. QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS

Microglial loading was defined as the percentage of area stained with anti-Iba1 (total microglia), anti-CD45 (activated microglia), anti-Trem2, anti-Gal3 or anti-Ferritin related to the hippocampal area analyzed (CA1). Immunostained sections were examined under a Nikon Eclipse 80i microscope and images were acquired with a Nikon DS-5M digital camera using the ACT-2U imaging software (Nikon corporation). The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images from APP/PS1 and WT mice were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The immunopositive signal within the selected brain region was converted into 8-bit gray scale, and immunostained cells were identified by a threshold level mask. The threshold level was maintained throughout the whole image analysis for uniformity. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time with same batches of solutions. *Plaque loading* was defined as the percentage of total area (CA1, subiculum or total hippocampus) immunostained with the anti-A β antibody (OC or A β ₄₂) or stained with Thioflavin-S. The image analysis was carried out as described above. *Plaque number and plaque size* were analyzed using Thioflavin-S stained sections and was performed as described above (for CA1 region, measuring the area of plaques) or using Imaris 7.2.3 analysis software (for subiculum, measuring the volume of plaques). Density (plaques/mm²) and percentage of plaques ranging from <200 μ m² to >1000 μ m² was calculated. *Periplaque microglia loading* was defined as the percentage of total volume stained with microglial markers (CD45 and Ferritin) surrounding each fibrillar plaque (Thioflavin-S stained), randomly selected, of the CA1 region. Triple CD45/Ferritin/ThioS confocal Z-stack images were processed using Visilog 6.3 software as previously explained. *Plaque oligomeric halo estimation* was done using double OC/ThioS confocal images from CA1 plaques, randomly selected. Images were then analyzed with Leica LAS AF lite program calculating both, halo and core area, and using the following formula: halo area = (OC-positive area) – (ThioS-positive area).

6.3.9. STEREOLOGICAL ANALYSIS

The size of Congo red stained amyloid plaques and the number and size of dystrophies around them were obtained by stereology-based quantification in the hippocampal formation of APP/PS1 at 4, 6 and 12 months of age (n = 4/age; 4 sections per animal). Briefly, an Olympus BX61 microscope and the NewCAST software package (Olympus, Glostrup, Denmark) were used. Plaques analyzed were randomly sampled in the hippocampus and the quantification was done using a 40x objective. Neurite and plaque sizes were estimated by the nucleator application with isotrophic probes (n = 5 radii). The number of APP-positive dystrophic neurites per plaque was quantified over Congo red stained A β deposits.

A β load for the experiments with 3xTgAD and hA β -KI mice was measured by using stereological quantification via Stereoinvestigator software and the Area Fractionator Fraction

probe (Microbrightfield, Williston, VT, USA). This probe is designed to estimate the fraction of a region (hippocampus) occupied by a sub-region (A β load). The quantification was done in the hippocampus of 6E10 immunostained sections. For this quantification, we used a counting frame size of 200 μ m x 200 μ m, XY placement counting frames of 300 μ m x 300 μ m, grid size of 15 μ m and a 10x objective. A total of 5-7 mice were used for each group.

6.3.10. METABOLITES QUANTIFICATION

HR-MAS NMR (*High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*) spectroscopy was used to obtain the metabolic profiles of the dissected samples. Briefly, hippocampus and neocortex of WT and APP mice were quickly removed under cold conditions, frozen and stored at -80°C. Samples were thawed at 4°C and then cut (5-20 mg) to fit into cylindrical inserts. The inserts were placed into an HR-MAS zirconium rotor (4 mm OD) and transferred to the HR-MAS probe, which was cooled to 4°C. The HR-MAS spectra were acquired on a Bruker Advance™ 600MHz spectrometer at 4°C at a 5 kHz spinning rate. For absolute metabolite quantification, an artificial reference signal was added into each NMR spectrum using the ERETIC method (*Electronic Reference To access In vivo Concentrations*) implemented in TopSpin 3.1 (Bruker BioSpin), which is based on the PULCON principle (*Pulse Length-based Concentration determination*) that originates from the principle of reciprocity. This artificial peak was used as an internal reference for the concentration determination with LCMModel (*Linear Combination of Model Spectra*) program.

6.3.11. TRANSCRIPTOMIC PROFILING OF ACTIVATED MICROGLIA

Gene expression profile of reactive microglia from 3 and 12-month-old APP mice was analyzed. Briefly, dissected hippocampus and cortex were first mechanically and chemically digested and then dissociated using nylon cell screens (100 μ m), centrifuged, resuspended in 90% Percoll and centrifuged again for myelin and debris removal. For specific microglial cells isolation, brain cells were labeled with anti-CD45-PE (HI30 clone, Immunostep), anti-CD11b-CFBlue (M1/70 clone, Immunostep) and anti-Clec7a (FAB14561Gm, R&D Systems). Cells were then separated using the cell separator FACS Aria Fusion (Becton Dickinson) by the identification of surface receptor expression. RNA from microglia was then extracted using TriPure Isolation Reagent (Roche), purified using the ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation system (Applied Biosystems) and RNA integrity was then determined by an Agilent RNA Nano 6000 kit. Finally, for the transcriptomic study, the microarray Clariom™S Pico Assay mouse (ThermoScientific) was utilized. Data was normalized using the RMA (*Robust Multi-Array*) method and analyzed using TAC (*Transcriptome Analysis Console*; Affymetrix, ThermoScientific) software and GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) system, by Gene Ontology (GO).

6.3.12. IN VIVO A β SEEDING

Seven to eight-month-old hA β -KI and 3xTgAD mice (n=5-9/genotype/group) received a single injection of 2.5 μ l of cortical brain soluble S1 fraction from an AD patient (Braak stage VI provided by the Alzheimer's Disease Research Center at UCI; UCI-ADRC) or PBS into the right hippocampus. The left non-injected hippocampus was used as internal control. Briefly, brain

cortical samples were homogenized at 10% (w/v) in sterile PBS, vortexed, sonicated 3 x 5 sec and centrifuged at 3,000 x g for 5 minutes. The supernatant was used as the seeding agent and administrated to 7-8 months-old mice following Bregma coordinates -1.8mm posterior, -1.8mm lateral and -1.8mm dorsal-ventral. Mice were euthanized 5 or 10 months after injection (3xTgAD or hA β -KI, respectively) of the human extract seed.

4 months-old APP and WT mice (n=11-16/genotype/group) were also assayed as described above, injecting 2 μ l of brain soluble S1 fractions from AD patients (Braak V-VI) or from APP/PS1 18 months-old-mice. Control APP or WT groups were injected with sterile PBS. Behavior analysis was performed 3 months after injection. Mice were euthanized 4 months after injection.

6.3.13. BEHAVIORAL ANALYSIS

Injected APP and WT mice and non-injected age-matched controls (n=11-16/group) were behavioral conducted at seven months of age using the open field test. Testing was performed in the light period of the cycle and animals were adapted to the experimental conditions 1 hour before behavioral test. Briefly, mice were placed in the center of a square-shape arena (40 cm x 40 cm) and were allowed to explore the area for 5 minutes. The arena was thoroughly cleaned with 70% ethanol solution after each trial. The locomotor activity was measured by an automated monitoring system (Ethovision XT 7, Noldus). Distance travelled, velocity and time spent in the inner/outer area of the arena were quantified.

6.3.14. STATISTICAL ANALYSIS

Normally distributed data were expressed as the mean \pm SD. Mean values were compared using ANOVA followed by Tukey's test (more than two groups) or two-tailed-t-test for two group comparisons. Non-normally distributed data were represented using box-plots (Sigmaplot) or scatter-plots with the median and interquartile range (GraphPad), and compared with the Mann-Whitney U test (for two groups comparisons) or Kruskal-Wallis tests (more than two groups) followed by Dunn's post-hoc test. The significance was set at 95 % of confidence. Linear correlations were analyzed using the Spearman or Pearson tests.

6.4. RESULTS AND DISCUSSION

6.4.1. PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF AMYLOID PATHOLOGY IN THE HIPPOCAMPUS OF APP/PS1 MICE DURING THE DISEASE PROGRESSION

The presence of extracellular deposits (plaques) of A β in the brain is one of the protein lesions that characterize AD brains, starting building up to 30 years before the onset of clinical symptoms. However, the relationship between amyloid pathology and AD is subject of considerable controversy, since there are cognitively normal individuals with a substantial amount of plaques in their brains and people with AD dementia with few plaques (Gomez-Isla et al. 2008; Perez-Nievas et al. 2013; revisado en Morris et al. 2018). It has been proposed that

soluble oligomeric forms of A β , instead of the plaques themselves, could play a more important role in synaptic and neuronal damage and, in consequence, in cognitive impairment in Alzheimer's disease. It is unknown if in those individuals susceptible for developing cognitive decline plaques undergo changes in their properties during the progression of the disease, becoming more toxic and releasing soluble oligomers. Therefore, one of the objectives of this work has been to analyze the possible differences in the phenotypic properties of plaques during the progression of the pathology in a transgenic amyloidogenic model with age.

In this work, first, the progression of amyloid pathology in the hippocampus of 4, 6, 12 and 18 months of age APP/PS1 mice was studied using immunohistochemical staining using anti-A β_{42} as well as Thioflavin-S staining for fibrillar plaques. The load (total hippocampal area occupied by plaques), amount (plaques/mm²) and size (μ m²) of the amyloid plaques significantly increased with age, as measured by image analysis in the CA1 region and subiculum. Morphological examination revealed that most plaques were fibrillar and neuritic, with a filamentous aspect or with a small compact dense core. All the amyloid deposits in the hippocampus of our transgenic mice were identified as human-like neuritic plaques with dystrophic neurites and reactive gliosis. Since neuritic plaques are more likely to be associated with cognitive impairment than diffuse plaques in AD patients, we further analyzed the potential changes in the evolution of neuritic plaques as part of the disease process in our model.

Regarding the disease-dependent progression of the toxicity of the plaques, the size of the ring of oligomeric A β that surrounds plaques (toxic halo) was proportional to the size of the core. Considering that the amount of large plaques was higher at advanced ages compared with young animals, the total oligomeric halo increased with disease progression, which agree with the significant increase in the content of soluble oligomeric A β in the hippocampus of this model. These data indicate that amyloid plaques are dynamic structures which not only increase in size with the progression of the pathology, but could also change their toxic properties, measured by the size of the oligomeric halo. Next, we wondered whether the increase in plaque size, as disease progresses, was associated with higher plaque reactivity (capacity to induce neuronal damage) by measuring the number of dystrophic neurites that surround plaques. The number of dystrophic neurites per plaque increased with age in parallel with the size of the plaque. Results showed that, in fact, the number of these dystrophic neurites correlated with the size of the plaque and was independent of the age of the mice. TEM analysis showed that dystrophic neurites were massively filled with collections of autophagic vesicles consisting of double membrane-bound vesicles with densely compacted amorphous or multilamellar contents named as autophagosomes. The number of dystrophic neurites per plaque perimeter (μ m) revealed a significant reduction at 12 months of age compared to 4 months-old mice. This might be a consequence of the neurodegenerative process at advanced stage of the disease and loss of neurons.

Amyloid accumulation is considered a key event in AD pathology by causing glial activation, neuritic alteration, synaptic damage and neuronal death. However, so far, all the A β -directed therapeutic targets have failed in clinical trials to halt or slow disease progression (Cummings et al. 2019), revealing that the appropriate A β therapeutic targets still have not

been identified. Plaques may serve as a reservoir for toxic soluble A β aggregates, sequestering them from other targets in the extracellular space and thereby preventing their toxicity. As disease progresses, plaques may undergo qualitative changes releasing oligomers to the parenchyma.

Though we have not detected changes in the plaque toxicity with the progression of the disease in the APP/PS1 transgenic mice, this could be due to the fact that it is a model of the familial form of Alzheimer's with a very aggressive pathology. A major limitation of most current transgenic animal models is that they display a stronger amyloid pathology than patients. Therefore, it is of great importance to develop amyloidogenic models for the sporadic form of the disease.

6.4.2. INTERACTION BETWEEN AMYLOID PLAQUES AND ACTIVATED MICROGLIA IN APP/PS1 HIPPOCAMPUS. MICROGLIAL SUBTYPES AND DISEASE-DEPENDENT CHANGES

In both Alzheimer's patients and animal models, amyloid pathology is accompanied by microglial cell activation. Various microglial genes are associated with higher risk for developing AD, however, the function of these cells in the pathogenic process is still unknown. Our group has recently described significant microglial degeneration in the hippocampus of AD patients (Sanchez-Mejias et al. 2016; Navarro et al. 2018; Gutierrez and Vitorica 2018), a fact that is not replicated by amyloidogenic models. However, it is not known if in these models the functional properties of the microglia surrounding the plaques change during the progression of the pathology affecting the toxicity of the amyloid plaques. Based on all the above, in this work we have characterized the disease-dependent changes in plaque-associated microglia in the hippocampus of APP/PS1 model from 4 to 18 months of age. For this, transcriptomic studies, immunohistochemical techniques for bright field, confocal and electron microscopy, along with image analysis techniques have been used.

An initial characterization of the microglial response in the hippocampus of APP/PS1 mice from 4 to 18 months of age was made analyzing the activated microglial load, as area occupied by CD45-immunopositive cells. A significant increase was found from 4 to 12 months of age, that correlated with the increase in A β load (OC-positive area). However, from 12 to 18 months of age no further increase in microglial load was found, though A β kept building up significantly. Therefore, at 12 months of age microglia have less responsiveness and probably are less effective in counteracting amyloid pathology. This suggests the existence of a microglial degenerative/dysfunctional process and/or reduced microglial turnover at advanced stage of the disease.

The transcriptomic analysis of isolated activated microglia from APP mice revealed a significant increase in the expression of DAM (disease-associated microglia) gene signature (i.e. *CD68*, *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP* and *APOE*, among others), while the homeostatic genes (i.e. *CSF1R*, *CX3CR1*, *P2RY12* and *TMEM119*) were downregulated, at 12 months compared to 3 months-old mice. Some of the DAM genes that increase with age, such as *LGALS3*, *TREM2*, *TYROBP*, *H2-L*, *H2-D1* and *APOE*, are risk factors for the development of late-onset AD. Next, we analyzed, at the cellular and subcellular level, some of these DAM microglial markers and

their relationship with amyloid plaques. The periplaque DAM microglia showed Thioflavin-S labeling (fibrillar amyloid) intracellularly, both associated and non-associated with lysosomes. These microglial cells displayed ultrastructural features of phagocytic activity indicating a role for these cells in A β clearance. We observed that microglia could also be involved in the phagocytosis of dystrophic neurites. These findings go along with the fact that DAM microglia around plaques overexpress genes related with phagocytosis and lysosomal activity (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017). Using electron microscopy several subtypes of activated microglia around plaques were identified including the dark microglia (Bisht et al. 2016) with a high electron-dense cytoplasm and signs of high phagocytic activity. Interestingly, another microglial subtype was characterized by a high content of rough endoplasmic reticulum pointing to a biosynthetic role. In this sense, the presence of amyloid plaque-like structures non-associated with lysosomes (at both confocal and electron microscopy) within the microglia cytoplasm might be a morphological evidence for a potential role of this glial cell subtype in plaque formation. This is supported by recent findings of Spangenberg et al. (2019), who depleted microglia in an AD animal model and found that the formation of plaques was dramatically reduced. The formation of the amyloid plaques by microglial cells could be a protective mechanism, by which soluble A β forms are removed from the extracellular compartment and sequester into less reactive insoluble structures. It is tempting to speculate that the capacity of the microglia to form plaques determines the efficiency of the brain to counteract the high concentrations of A β and prevent neuronal damage and cognitive deficits. This hypothesis would explain the disease resilience in the case of high pathology controls. Therefore, the idea of inhibiting microglial activation as a therapy for Alzheimer's, especially in the early stages, does not seem an effective option in view of the protective functions of these glial cells.

We have also studied the expression of galectin3 (a carbohydrate-binding protein) and ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) in DAM microglia by confocal and electron microscopy. Both molecules have been associated with A β aggregation/compaction (Venegas et al. 2017; Boza-Serrano et al. 2019) and they are expressed by periplaque microglia. In our model the location of these markers was mostly associated to microglia not plaques, though some immunolabeling was found to amyloid fibrils at TEM level. Then, microglia may play a critical role in A β plaque dynamics by releasing A β cross-seeding agents, such as gal3 and ASC.

Another DAM gene highly expressed by activated CD45-positive microglia is *TREM2*, coding for a microglial receptor that drive DAM phenotype. Individuals with rare variations in the gene encoding *TREM2* have an increased risk for AD that is comparable to the risk conferred by having the single *APOE4* allele. It has been suggested that *TREM2* plays a crucial role in plaque isolation, since *TREM2* deficiency seriously affects the microglial barrier of plaques (Yuan et al. 2016). At light microscopy we observed that the *TREM2*-positive microglia processes formed a ring around the plaque core creating a barrier to encapsulate dense plaques effectively isolating the A β peptide from surrounding neurons. By insulating plaques, *TREM2* microglia might change plaque structure to make them less toxic. Microglia constitute a barrier with profound impact on plaque composition and toxicity. Our results showed that, as disease progresses in the APP/PS1 hippocampus, the loading for *TREM2* immunolabeling

increases with age, reaching a maximum at 12 months, with no further progression even though plaque loading keeps increasing. Then, and like CD45 marker, this finding points to a dysfunctional microglial phenotype and/or a reduction in microglial turnover at advanced stage of the pathology. In this regard, in the hippocampus we found an age-dependent increase in ferritin, a marker for microglial senescence and oxidative stress (Lopes et al. 2008). We also analyzed the microglial coverage around plaques and found an increase in ferritin coverage with age, accompanied with a decrease in CD45, suggesting that plaques possibly cause loss of activation and degeneration in microglia. Besides, the coverage of plaques strongly depends on the size, being the large deposits less covered and more toxic, with an increased number of dystrophies around them. At the ultrastructural level, we found signs of degeneration in microglia around amyloid plaques, such as dystrophic processes, endoplasmic reticulum dilation and morphological abnormalities in mitochondria. This suggests low biosynthetic activity, high oxidative stress and altered mitochondrial energy metabolism, leading to dysfunctionality/degeneration of microglia. Even though microglial degeneration is much more prominent in the brain of AD cases (Sanchez-Mejias et al. 2016; Navarro et al. 2018; Gutierrez and Vitorica 2018), our murine model also shows age-dependent changes in microglia that could impair their correct function in forming/aggregating/isolating amyloid plaques.

As summary and taking into account the protective functions of the periplaque activated microglia, and the loss of function of these cells with the progression of the disease, it would be of great interest to develop therapies aimed at restoring the microglial function to reduce the toxic effect of plaques and neuronal damage. Until now, the classical view of cytotoxic microglial activation in response to the accumulation of amyloid plaques has dominated the field of Alzheimer's disease, however, the latest advances in this field and the results of this Doctoral Thesis point to the activated microglia as a CNS protective response aimed at controlling amyloid pathology.

6.4.3. *IN VIVO* ANALYSIS OF A β SEEDING IN FAMILIAL AND SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE MODELS

Several neurodegenerative diseases, such as Parkinson's, Huntington and Alzheimer's disease, are characterized by the accumulation of abnormally folded proteins. In Alzheimer's disease, both Tau and A β share some features with prion proteins, they can acquire a pathological conformation and spread over the brain inducing misfolding and aggregation of the native isoforms of these proteins (see reviews Morales et al. 2015b, Eisele and Duyckaerts 2016). A β native monomers have an α -helix rich structure, but the abnormally folded forms are rich on β -sheet and, therefore, more prone to aggregation (Moreno-Gonzalez and Soto 2011; Eisele and Duyckaerts 2016). Regarding the propagation of A β , many experiments in amyloid-based animal models show that the injection of A β seeds can cause an acceleration of the amyloid pathology. This has been seen using brain homogenates and soluble fractions that come from humans (AD, MCI and non-demented aged individuals) and amyloidogenic animal models (Kane et al. 2000; Duran-Aniotz et al. 2013; Fritschy et al. 2014; Duran-Aniotz et al. 2014; Morales et al. 2015a). In this work, we have tested the effect of the inoculation of A β seed-containing soluble brain fractions (S1) in the hippocampus of animal models for the

familial form (APP, 3xTgAD) and the sporadic form (hA β -KI) of Alzheimer's disease, and also in WT mice.

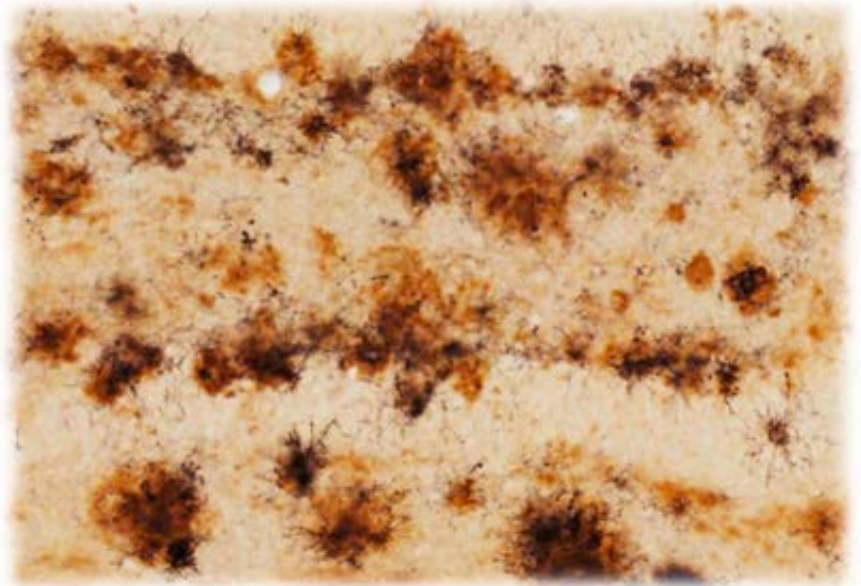
In APP mice injections were performed in the right hippocampus when they were 4 months-old. Injections of S1 fractions from the hippocampus of AD patients (Braak V-VI) and APP/PS1 mice (18 months) caused acceleration in amyloid pathology, both in the injected and the non-injected hippocampus, with more A β load than animals injected with PBS. Therefore, the period of incubation (4 months) seemed sufficient for the propagation of the seeds to the contralateral (non-injected) hemisphere. Despite S1 both from humans and from mice induced the formation of fibrillar plaques, APP/PS1 fractions seemed to have more capacity of forming fibrillar plaques. This can be due to the higher amount of A β in transgenic models overexpressing APP mutations in comparison with human tissue, bearing fewer plaques. Besides, the nature of the seeds present in transgenic mice and AD patients might be different, so they could differ in their ability to induce aggregation in a murine environment. In fact, the existence of different strains of A β seeds (with distinct toxicity and nucleation capacity) has been described (Petkova et al. 2005; Morales et al. 2015b; Eisele and Duyckaerts 2016). The presence of many plaques in the alveus region (a layer formed by myelinic axons) of the injected hippocampus suggests that this could be a sign of propagation to the contralateral hemisphere via synaptic circuits. Microglia could also participate in the propagation of A β seeds, since it is described that they mediate in the seeding of Tau (Maphis et al. 2015; Asai et al. 2015; EL Andaloussi et al. 2013; Perea et al. 2018).

In WT mice, the injections of S1 fractions failed to induce the formation of amyloid plaques *de novo*. This is explained because of the differences between the amino-acid sequence of murine and human A β , being the latter more prone to aggregation (Jankowsky et al. 2007). To induce *de novo* plaques in non-plaque bearing mice, it is necessary to have the human APP gene or to co-inject an aggregating agent as galectin 3 together with A β seeds (Morales et al. 2012; Boza-Serrano et al. 2019).

Seeding experiments with 3xTgAD and hA β -KI mice were carried out during a research stay in the laboratory of Dr. Frank M. LaFerla at the University of California, Irvine (United States). These mice were injected in the right hippocampus when they were 7 to 8 months-old, and they were divided in two groups for different periods of incubation (5 or 10 months) to assess the importance of incubation time in these models. The soluble fraction came from the frontal cortex of an individual with advanced AD pathology (Braak VI). In 3xTgAD, an incubation period of 5 months resulted in an increment in amyloid pathology in the injected hippocampus, but not in the contralateral one. With an incubation of 10 months after injection, the amyloid pathology spread to the contralateral hemisphere. Therefore, an incubation of 5 months was not sufficient in this model for the seeds to propagate to the non-injected hemisphere. 3xTgAD mice needed more time for the propagation of the seeds than APP mice. In the hA β -KI model, changes in amyloid pathology were detected only 10 months after surgery, since this animal model, representing the sporadic form of AD, has a very mild amyloid pathology in comparison with most AD models, which are based in familial AD mutations. The propagation of the seeds only occurred in the injected hemisphere, with higher A β load than the non-injected hemisphere and the PBS-treated control mice.

Altogether, our results show that the propagation of A β seeds not only depends on the concentration, origin and nature of these seeds, but also on the characteristics of the host animal model (nature of the A β present in the host, age of the host) and the time of incubation after injection of the seeds.

7. Bibliografía



- Abbott A. 2018. Is 'friendly fire' in the brain provoking Alzheimer's disease? *Nature* **556**: 426–428.
- Agostinho P, Plíassova A, Oliveira CR, Cunha RA. 2015. Localization and Trafficking of Amyloid- β Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* **45**: 329–347.
- Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. 2013. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* **339**: 156–61.
- Andersen P. 2007. *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Ando K, Brion J-P, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R, Chanut A, Lacor P, Lavaur J, Sazdovitch V, et al. 2013. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol* **125**: 861–878.
- Andrew RJ, Kellett KAB, Thinakaran G, Hooper NM. 2016. A Greek tragedy: The growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. *J Biol Chem* **291**: 19235–19244.
- Androuin A, Potier B, Nägerl UV, Cattaert D, Danglot L, Thierry M, Youssef I, Triller A, Duyckaerts C, El Hachimi KH, et al. 2018. Evidence for altered dendritic spine compartmentalization in Alzheimer's disease and functional effects in a mouse model. *Acta Neuropathol* **135**: 839–854.
- Angelova DM, Brown DR. 2019. Microglia and the Aging Brain: Are Senescent Microglia the Key to Neurodegeneration? *J Neurochem* 1–13.
- Arbor SC, Lafontaine M, Cumbay M. 2016. Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med* **89**: 5–21.
- Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kügler S, Ikezu T. 2015. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* **18**: 1584–93.
- Askew K, Gomez-Nicola D. 2018. A story of birth and death: Insights into the formation and dynamics of the microglial population. *Brain Behav Immun* **69**: 9–17.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, et al. 2010. Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J AlzheimersDis* **21**: 119–132.
- Baglietto-Vargas D, Sánchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Gómez-Arboledas A, Sánchez-Mico M, Sánchez-Varo R, Vizuete M, Dávila JC, et al. 2017. Dual roles of A β in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* **7**: 10085.
- Baik SH, Kang S, Son SM, Mook-Jung I. 2016. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*. **64**: 2274–2290.
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ceyzériat K, Escartin C. 2015. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* **9**: 278.
- Bisht K, Sharma K, Lacoste B, Tremblay M-È. 2016a. Dark microglia: Why are they dark? *Commun Integr Biol* **9**: e1230575.
- Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Sánchez MG, El Hajj H, Milior G, Olmos-Alonso A, Gómez-Nicola D, Luheshi G, Vallières L, et al. 2016b. Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* **64**: 826–39.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, et al. 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *ExpNeurol* **184**: 247–263.
- Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. 2010. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease.

- NatRevNeurol* **6**: 131–144.
- Bloom GS. 2014. Amyloid- β and Tau. *JAMA Neurol* **71**: 505.
- Blume T, Focke C, Peters F, Deussing M, Albert NL, Lindner S, Gildehaus F-J, von Ungern-Sternberg B, Ozmen L, Baumann K, et al. 2018. Microglial response to increasing amyloid load saturates with aging: a longitudinal dual tracer in vivo μ PET-study. *J Neuroinflammation* **15**: 307.
- Boza-Serrano A, Ruiz R, Sanchez-Varo R, García-Revilla J, Yang Y, Jimenez-Ferrer I, Paulus A, Wennström M, Vilalta A, Allendorf D, et al. 2019. Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **138**: 251–273.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–59.
- Brettschneider J, Tredici K Del, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. 2015. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* **16**: 109–120.
- Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, Garcia-Quintanilla A, Kavanagh E, Santiago M, Viceconte N, Oliva-Martin MJ, Osman AM, et al. 2015. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell Rep* **10**: 1626–1638.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* **22**: 183–92.
- Butovsky O, Weiner HL. 2018. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* **19**: 622–635.
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al. 2007. Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Abeta peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *JNeurosciRes* **85**: 787–797.
- Calderon-Garcidueñas AL, Duyckaerts C. 2018. Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol* **145**: 325–337.
- Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M. 2015. Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* **9**: 138.
- Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. 2000. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* **50**: 305–315.
- Capani F, Quarracino C, Caccuri R, Sica REP. 2016. Astrocytes As the Main Players in Primary Degenerative Disorders of the Human Central Nervous System. *Front Aging Neurosci* **8**: 4–9.
- Carmona S, Zahs K, Wu E, Dakin K, Bras J, Guerreiro R. 2018. The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* **17**: 721–730.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. 2010. Alzheimer disease. *Disease-a-Month* **56**: 484–546.
- Chen G-F, Xu T-H, Yan Y, Zhou Y-R, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. 2017. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* **38**: 1205–1235.
- Colby DW, Prusiner SB. 2011. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a006833.
- Colonna M, Butovsky O. 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* **35**: 441–468.
- Condello C, Yuan P, Grutzendler J. 2018. Microglia-Mediated Neuroprotection, TREM2, and Alzheimer's Disease: Evidence From Optical Imaging. *Biol Psychiatry* **83**: 377–387.

- Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J. 2015. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat Commun* **6**: 6176.
- Cronk JC, Filiano AJ, Louveau A, Marin I, Marsh R, Ji E, Goldman DH, Smirnov I, Geraci N, Acton S, et al. 2018. Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J Exp Med* **215**: 1627–1647.
- Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. 2019. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's Dement (New York, N Y)* **5**: 272–293.
- D'Orange M, Aurégan G, Cheramy D, Gaudin-Guérif M, Lieger S, Guillermier M, Stimmer L, Joséphine C, Hérard AS, Gaillard MC, et al. 2018. Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain* **141**: 535–549.
- Daria A, Colombo A, Llovera G, Hampel H, Willem M, Liesz A, Haass C, Tahirovic S. 2016. Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *EMBO J* **36**: 583–603.
- DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Serenó L, Rodríguez M, Sánchez B, Hyman BT, Gómez-Isla T. 2011. Brain oligomeric β -amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**: 360–76.
- Davies CA, Mann DMA, Sumpter PQ, Yates PO. 1987. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **78**: 151–164.
- Dawson TM, Golde TE, Lagier-Tourenne C. 2018. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* **21**: 1370–1379.
- De Strooper B. 2003. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**: 9–12.
- De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. 2012. Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006304.
- Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. 2018. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell* **173**: 1073–1081.
- DeKosky ST, Scheff SW. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* **27**: 457–464.
- DeTure MA, Dickson DW. 2019. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **14**: 32.
- Drayer BP. 1988. Imaging of the aging brain. Part I. Normal findings. *Radiology* **166**: 785–96.
- Drummond E, Wisniewski T. 2016. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* **133**: 155–175.
- Duran-Aniotz C, Morales R, Moreno-Gonzalez I, Hu PP, Fedynyshyn J, Soto C. 2014. Aggregate-depleted brain fails to induce A β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **9**: e89014.
- Duran-Aniotz C, Morales R, Moreno-Gonzalez I, Hu PP, Soto C. 2013. Brains from non-Alzheimer's individuals containing amyloid deposits accelerate A β deposition in vivo. *Acta Neuropathol Commun* **1**: 76.
- Edwards FA. 2019. A Unifying Hypothesis for Alzheimer's Disease: From Plaques to Neurodegeneration. *Trends Neurosci* **42**: 310–322.
- Eggert S, Thomas C, Kins S, Hermey G. 2017. Trafficking in Alzheimer's Disease: Modulation of APP Transport and Processing by the Transmembrane Proteins LRP1, SorLA, SorCS1c, Sortilin, and Calsyntenin. *Mol Neurobiol* **55**: 5809–5829.
- Eisele YS, Duyckaerts C. 2016. Propagation of

- Abeta pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol* **131**: 5–25.
- EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 347–357.
- Elmore MRP, Hohsfield LA, Kramár EA, Soreq L, Lee RJ, Pham ST, Najafi AR, Spangenberg EE, Wood MA, West BL, et al. 2018. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell* **17**: e12832.
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL. 2013. Amyloid- β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol* **73**: 104–19.
- Evin G, Weidemann A. 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* **23**: 1285–1297.
- Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. 2017. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci* **40**: 347–357.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 2008. *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Frere S, Slutsky I. 2018. Alzheimer's Disease: From Firing Instability to Homeostasis Network Collapse. *Neuron* **97**: 32–58.
- Fritschi SK, Cintron A, Ye L, Mahler J, Bühler A, Baumann F, Neumann M, Nilsson KPR, Hammarström P, Walker LC, et al. 2014a. A β seeds resist inactivation by formaldehyde. *Acta Neuropathol* **128**: 477–484.
- Fritschi SK, Langer F, Kaeser SA, Maia LF, Portelius E, Pinotsi D, Kaminski CF, Winkler DT, Maetzler W, Keyvani K, et al. 2014b. Highly potent soluble amyloid- β seeds in human Alzheimer brain but not cerebrospinal fluid. *Brain* **137**: 2909–2915.
- Füger P, Hefendehl JK, Veeraraghavalu K, Wendeln A-C, Schlosser C, Obermüller U, Wegenast-Braun BM, Neher JJ, Martus P, Kohsaka S, et al. 2017. Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging. *Nat Neurosci* **20**: 1371–1376.
- Galimberti D, Fenoglio C, Lovati C, Venturelli E, Guidi I, Corrà B, Scalabrini D, Clerici F, Mariani C, Bresolin N, et al. 2006. Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**: 1763–1768.
- Giannakopoulos P, Kövari E, French LE, Viard I, Hof PR, Bouras C. 1998. Possible neuroprotective role of clusterin in Alzheimer's disease: a quantitative immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* **95**: 387–94.
- Gibbons GS, Lee VMY, Trojanowski JQ. 2018. Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review. *JAMA Neurol* **76**: 101–108.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, et al. 2010. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* **330**: 841.
- Ginhoux F, Williams M. 2016. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**: 439–449.
- Giri M, Zhang M, Lü Y. 2016. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging* **11**: 665–81.
- Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**: 704–706.
- Goate A, Owen M, James L, Mullan M, Rossor M, Haynes A, Farrall M, Lai LC, Roques P, Williamson R, et al. 1989. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* **333**: 352–355.

- Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Díaz C, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L, Fernandez-Valenzuela JJ, Vizuite M, et al. 2017. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia* **66**: 637–653.
- Gomez-Isla T, Spire T, De Calignon A, Hyman BT. 2008. Neuropathology of Alzheimer's Disease. In *HandBook of Clinical Neurology*, pp. 233–243.
- Götz J, Bodea LG, Goedert M. 2018. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **19**: 583–598.
- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. 2001. Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by Abeta 42 Fibrils. *Science* **293**: 1491–1495.
- Götz J, Ittner LM. 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* **9**: 532–544.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, et al. 2000. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* **156**: 15–20.
- Grathwohl SA, Kälin RE, Bolmont T, Prokop S, Winkelmann G, Kaeser SA, Odenthal J, Radde R, Eldh T, Gandy S, et al. 2009. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci* **12**: 1361–3.
- Gratuze M, Leyns CEG, Holtzman DM. 2018. New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **13**: 66.
- Guedes JR, Lao T, Cardoso AL, El Khoury J. 2018. Roles of Microglial and Monocyte Chemokines and Their Receptors in Regulating Alzheimer's Disease-Associated Amyloid- β and Tau Pathologies. *Front Neurol* **9**: 549.
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeve E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JSK, Younkin S, et al. 2013. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **368**: 117–27.
- Guerriero F, Sgarlata C, Francis M, Maurizi N, Faragli A, Perna S, Rondanelli M, Rollone M, Ricevuti G. 2017. Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clin Exp Res* **29**: 821–831.
- Guimas Almeida C, Sadat Mirfakhar F, Perdigão C, Burrinha T. 2018. Impact of late-onset Alzheimer's genetic risk factors on beta-amyloid endocytic production. *Cell Mol Life Sci* **75**: 2577–2589.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. 1988. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**: 857–881.
- Gutierrez A, Vitorica J. 2018. Toward a New Concept of Alzheimer's Disease Models: A Perspective from Neuroinflammation. *J Alzheimer's Dis* **64**: S329–S338.
- Halassa MM, Haydon PG. 2010. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* **72**: 335–55.
- Hansen D V, Hanson JE, Sheng M. 2018. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* **217**: 459–472.
- Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353–356.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184–5.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Williams A, et al. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**: 1088–93.

- Harper JD, Lansbury PT. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* **66**: 385–407.
- Hecht M, Krämer LM, von Arnim CAF, Otto M, Thal DR. 2018. Capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: association with allocortical/hippocampal microinfarcts and cognitive decline. *Acta Neuropathol* **135**: 681–694.
- Heilbronner G, Eisele YS, Langer F, Kaeser SA, Novotny R, Nagarathinam A, Aslund A, Hammarström P, Nilsson KPR, Jucker M. 2013. Seeded strain-like transmission of β -amyloid morphotypes in APP transgenic mice. *EMBO Rep* **14**: 1017–22.
- Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. 2017. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol* **309**: 12–22.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, et al. 2015a. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **14**: 388–405.
- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. 2015b. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* **16**: 229–236.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng T-C, et al. 2013. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* **493**: 674–8.
- Heneka MT, McManus RM, Latz E. 2018. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* **19**: 610–621.
- Henstridge CM, Hyman BT, Spires-Jones TL. 2019. Beyond the neuron–cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* **20**: 94–108.
- Herrup K. 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* **18**: 794–799.
- Herz J, Filiano AJ, Smith A, Yogev N, Kipnis J. 2017. Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity* **46**: 943–956.
- Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK, El Khoury J. 2013. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* **16**: 1896–905.
- Hol E, Pekny M. 2015. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* **32**: 121–130.
- Holtman IR, Raj DD, Miller JA, Schaafsma W, Yin Z, Brouwer N, Wes PD, Möller T, Orre M, Kamphuis W, et al. 2015. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol Commun* **3**: 31.
- Holtman IR, Skola D, Glass CK. 2017. Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *J Clin Invest* **127**: 3220–3229.
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, et al. 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* **337**: 1–9.
- Hong S, Ostaszewski BL, Yang T, O'Malley TT, Jin M, Yanagisawa K, Li S, Bartels T, Selkoe DJ. 2014. Soluble A β oligomers are rapidly sequestered from brain ISF in vivo and bind GM1 ganglioside on cellular membranes. *Neuron* **82**: 308–19.
- Hoss F, Rodriguez-Alcazar JF, Latz E. 2017. Assembly and regulation of ASC specks. *Cell Mol Life Sci* **74**: 1211–1229.
- Howard V, Reed M. 1998. *Unbiased stereology: three dimensional measurement in*

- microscopy. 1ª edición. Springer Berlin Heidelberg, Berlín.
- Howard V, Reed M. 2004. *Unbiased stereology: three dimensional measurement in microscopy*. 2ª edición. Springer Berlin Heidelberg, Berlín.
- Huynh T-P V, Davis AA, Ulrich JD, Holtzman DM. 2017a. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. *J Lipid Res* **58**: 824–836.
- Huynh T-P V, Liao F, Francis CM, Robinson GO, Serrano JR, Jiang H, Roh J, Finn MB, Sullivan PM, Esparza TJ, et al. 2017b. Age-Dependent Effects of apoE Reduction Using Antisense Oligonucleotides in a Model of β -amyloidosis. *Neuron* **96**: 1013–1023.
- in 't Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MMB, Stricker BHC. 2001. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and the Risk of Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **345**: 1515–1521.
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. 1989. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* **24**: 173–82.
- Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR. 2007. Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* **282**: 22707–20.
- Jay TR, Hirsch AM, Broihier ML, Miller CM, Neilson LE, Ransohoff RM, Lamb BT, Landreth GE. 2016. Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **37**: 637–647.
- Jay TR, von Saucken VE, Landreth GE. 2017. TREM2 in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurodegener* **12**: 56.
- Jeon S-B, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon S-H, Park EJ. 2010. Galectin-3 Exerts Cytokine-Like Regulatory Actions through the JAK–STAT Pathway. *J Immunol* **185**: 7037–7046.
- Jiang S, Li Y, Zhang X, Bu G, Xu H, Zhang Y. 2014a. Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **9**: 6.
- Jiang T, Tan L, Zhu X-C, Zhang Q-Q, Cao L, Tan M-S, Gu L-Z, Wang H-F, Ding Z-Z, Zhang Y-D, et al. 2014b. Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* **39**: 2949–62.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. 2008. Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *J Neurosci* **28**: 11650–11661.
- Jimenez S, Navarro V, Moyano J, Sanchez-Mico M, Torres M, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. 2014. Disruption of Amyloid Plaques Integrity Affects the Soluble Oligomers Content from Alzheimer Disease Brains ed. R. Trullas. *PLoS One* **9**: e114041.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, et al. 2011. Age-dependent accumulation of soluble amyloid β (A β) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- α (sAPP α) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.
- Jin SC, Benitez BA, Karch CM, Cooper B, Skorupa T, Carrell D, Norton JB, Hsu S, Harari O, Cai Y, et al. 2014. Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **23**: 5838–5846.
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson P V, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, et al.

2013. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **368**: 107–16.
- Joshi AU, Minhas PS, Liddel SA, Haileselassie B, Andreasson KI, Dorn GW, Mochly-Rosen D. 2019. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat Neurosci* **22**: 1635–1648.
- Jürgen KM, Paxinos G, Voss T. 2008. *Atlas of the human brain*. Academic Press.
- Kametani F, Hasegawa M. 2018. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* **12**: 25.
- Kane MD, Lipinski WJ, Callahan MJ, Bian F, Durham R a, Schwarz RD, Roher a E, Walker LC. 2000. Evidence for seeding of beta-amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci* **20**: 3606–11.
- Kang J, Müller-Hill B. 1990. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4695 mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* **166**: 1192–1200.
- Karran E, De Strooper B. 2016. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* **139**: 237–252.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B. 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 698–712.
- Kaufman SK, Sanders DW, Thomas TL, Ruchinskas AJ, Vaquer-Alicea J, Sharma AM, Miller TM, Diamond MI. 2016. Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron* **92**: 796–812.
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, et al. 2017. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **169**: 1276–1290.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**: 10–18.
- Khakh BS, Deneen B. 2019. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu Rev Neurosci* **42**: 187–207.
- Kierdorf K, Masuda T, Jordão MJC, Prinz M. 2019. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **20**: 547–562.
- Kim D, Tsai L-H. 2009. Bridging physiology and pathology in AD. *Cell* **137**: 997–1000.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, et al. 2009. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4012–4017.
- Kofuji P, Newman EA. 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* **129**: 1045–56.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, Gil SC, Brown J, Wilhelmsson U, Restivo JL, et al. 2013. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **27**: 187–198.
- Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O'Loughlin E, Xu Y, Fanek Z, et al. 2017. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* **47**: 566–581.
- Krüger L, Mandelkow EM. 2016. Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies. *Curr Opin Neurobiol* **36**: 52–58.

- Kumar DKV, Choi SH, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, Lefkowitz A, McCol G, Goldstein LE, Tanzi RE, et al. 2016. Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* **8**: 340ra72.
- LaFerla FM, Oddo S. 2005. Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* **11**: 170–176.
- Lautrup S, Lou G, Aman Y, Nilsen H, Tao J, Fang EF. 2019. Microglial mitophagy mitigates neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **129**: 104469.
- Lee S-J, Desplats P, Sigurdson C, Tsigenly I, Masliah E. 2010. Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. *Nat Rev Neurol* **6**: 702–6.
- Levy-Lahad E, Poorkaj P, Wang K, Fu YH, Oshima J, Mulligan J, Schellenberg GD. 1996. Genomic Structure and Expression of STM2, the Chromosome 1 Familial Alzheimer Disease Gene. *Genomics* **34**: 198–204.
- Lewis J. 2001. Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science* **293**: 1487–1491.
- Li Q, Barres BA. 2018. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* **18**: 225–242.
- Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu F-T, Springall T, Xu D. 2008. Galectin-3 Is a Negative Regulator of Lipopolysaccharide-Mediated Inflammation. *J Immunol* **181**: 2781–2789.
- Liang R. 2018. Cross Talk Between Aluminum and Genetic Susceptibility and Epigenetic Modification in Alzheimer's Disease. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **62**: 173–191.
- Liu C-C, Hu J, Zhao N, Wang J, Wang N, Cirrito JR, Kanekiyo T, Holtzman DM, Bu G. 2017. Astrocytic LRP1 Mediates Brain A β Clearance and Impacts Amyloid Deposition. *J Neurosci* **37**: 4023–4031.
- Liu C-C, Tsai C-W, Deak F, Rogers J, Penuliar M, Sung YM, Maher JN, Fu Y, Li X, Xu H, et al. 2014. Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Neuron* **84**: 63–77.
- Liu P, Reed MN, Kotilinek LA, Grant MKOO, Forster CL, Qiang W, Shapiro SL, Reichl JH, Chiang ACAA, Jankowsky JL, et al. 2015. Quaternary Structure Defines a Large Class of Amyloid- β Oligomers Neutralized by Sequestration. *Cell Rep* **11**: 1760–1771.
- Long JM, Holtzman DM. 2019. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* **179**: 312–339.
- Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. 2008. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia* **56**: 1048–1060.
- Lucin KM, Wyss-Coray T. 2009. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* **64**: 110–22.
- MacLeod R, Hillert E-K, Cameron RT, Baillie GS. 2015. The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Futur Sci OA* **1**: FSO11.
- Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P, Maxfield FR. 2007. Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol Biol Cell* **18**: 1490–6.
- Makin S. 2018. The amyloid hypothesis on trial. *Nat* **2018** **559**: S4–S7.
- Maphis N, Xu G, Kokiko-Cochran ON, Jiang S, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT, Bhaskar K. 2015. Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* **138**: 1738–1755.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van GP, Hartmann D, D'Hooge R, De SB, et al. 2008. Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* **27**: 224–233.

- Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. 2015. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim* **1**: 15056.
- Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, Gao F, Mohammadi S, Young JZ, Menon M, He L, Abdurrob F, Jiang X, et al. 2019. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature* **570**: 332–337.
- Mattson MP, Arumugam T V. 2018. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab* **27**: 1176–1199.
- Mazaheri F, Snaidero N, Kleinberger G, Madore C, Daria A, Werner G, Krasemann S, Capell A, Trümbach D, Wurst W, et al. 2017. TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO Rep* **18**: 1186–1198.
- McGeer PL, Kawamata T, Walker DG. 1992. Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. *Brain Res* **579**: 337–341.
- Mcmanus RM, Heneka MT. 2017. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther* **9**: 14.
- McQuade A, Blurton-Jones M. 2019. Microglia in Alzheimer's Disease: Exploring How Genetics and Phenotype Influence Risk. *J Mol Biol* **431**: 1805–1817.
- Meyer-luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, et al. 2006. Exogenous Induction of Cerebral by Agent and Host. *Science* **313**: 1781–1784.
- Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, et al. 2015. Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* **85**: 296–302.
- Moodley KK, Chan D. 2014. The hippocampus in neurodegenerative disease. *Hippocampus Clin Neurosci* **34**: 95–108.
- Morales R, Bravo-Alegria J, Duran-Aniotz C, Soto C. 2015a. Titration of biologically active amyloid- β seeds in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* **5**: 9349.
- Morales R, Callegari K, Soto C. 2015b. Prion-like features of misfolded A β and tau aggregates. *Virus Res* **207**: 106–112.
- Morales R, Duran-Aniotz C, Castilla J, Estrada LD, Soto C. 2012. De novo induction of amyloid- β deposition in vivo. *Mol Psychiatry* **17**: 1347–1353.
- Morales R, Moreno-Gonzalez I, Soto C. 2013. Cross-Seeding of Misfolded Proteins: Implications for Etiology and Pathogenesis of Protein Misfolding Diseases. *PLoS Pathog* **9**: 1–4.
- Moreau K, Fleming A, Imarisio S, Lopez Ramirez A, Mercer JL, Jimenez-Sanchez M, Bento CF, Puri C, Zavodszky E, Siddiqi F, et al. 2014. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun* **5**: 4998.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al. 2009. Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *JAlzheimersDis* **18**: 755–776.
- Moreno-Gonzalez I, Soto C. 2011. Misfolded protein aggregates: Mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 482–487.
- Morinaga A, Hirohata M, Ono K, Yamada M. 2007. Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **359**: 697–702.
- Morris GP, Clark IA, Vissel B. 2018. Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **136**: 663–689.
- Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, Muñoz-

- Castro C, Sanchez-Varo R, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. 2018. Microglia in Alzheimer's disease: Activated, dysfunctional or degenerative. *Front Aging Neurosci* **10**: 1–8.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Tredici K Del, et al. 2012. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**: 362–381.
- Nelson PT, Dickson DW, Trojanowski JQ, Jack CR, Boyle PA, Arfanakis K, Rademakers R, Alafuzoff I, Attems J, Brayne C, et al. 2019. Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE): consensus working group report. *Brain* **74**: 625–634.
- Newcombe EA, Camats-Perna J, Silva ML, Valmas N, Huat TJ, Medeiros R. 2018. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **15**: 276.
- Nickerson DA, Taylor SL, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengård JH, Salomaa V, Boerwinkle E, Sing CF. 2000. Sequence Diversity and Large-Scale Typing of SNPs in the Human Apolipoprotein E Gene. *Genome Res* **10**: 1532–1545.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.
- Ogata S, Ito S, Masuda T, Ohtsuki S. 2019. Changes of Blood-Brain Barrier and Brain Parenchymal Protein Expression Levels of Mice under Different Insulin-Resistance Conditions Induced by High-Fat Diet. *Pharm Res* **36**: 1–7.
- Olah M, Patrick E, Villani AC, Xu J, White CC, Ryan KJ, Piehowski P, Kapasi A, Nejad P, Cimpean M, et al. 2018. A transcriptomic atlas of aged human microglia. *Nat Commun* **9**: 539.
- Olmos-Alonso A, Schettters STT, Sri S, Askew K, Mancuso R, Vargas-Caballero M, Holscher C, Perry VH, Gomez-Nicola D. 2016. Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain* **139**: 891–907.
- Olsson TT, Klementieva O, Gouras GK. 2018. Prion-like seeding and nucleation of intracellular amyloid- β . *Neurobiol Dis* **113**: 1–10.
- Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM. 2015. Astroglia: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **144**: 121–41.
- Paloneva J, Manninen T, Christman G, Hovanes K, Mandelin J, Adolfsson R, Bianchin M, Bird T, Miranda R, Salmaggi A, et al. 2002. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* **71**: 656–62.
- Parhizkar S, Arzberger T, Brendel M, Kleinberger G, Deussing M, Focke C, Nuscher B, Xiong M, Ghasemigharagoz A, Katzmarski N, et al. 2019. Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nat Neurosci*. **22**: 191–204.
- Pera M, Alcolea D, Sánchez-Valle R, Guardia-Laguarta C, Colom-Cadena M, Badiola N, Suárez-Calvet M, Lladó A, Barrera-Ocampo AA, Sepulveda-Falla D, et al. 2013. Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **125**: 201–213.
- Perea JR, Llorens-Martín M, Ávila J, Bolós M. 2018. The Role of Microglia in the Spread of Tau: Relevance for Tauopathies. *Front Cell Neurosci* **12**: 172.
- Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, et al. 2013. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* **136**: 2510–2526.
- Perl DP. 2010. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 32–42.

- Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau W-M, Mattson MP, Tycko R. 2005. Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's beta-Amyloid Fibrils. *Science* **307**: 262–265.
- Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. 2009. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* **30**: 239–58.
- Pimenova AA, Raj T, Goate AM. 2018. Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* **83**: 300–310.
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. 2017. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol* **18**: 385–392.
- Prinz M, Priller J. 2017. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci* **20**: 136–144.
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. 2011. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* **14**: 1227–1235.
- Prusiner S. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136–144.
- Prusiner SB. 2013. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet* **47**: 601–23.
- Rajendran L, Paolicelli RC. 2018. Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* **38**: 2911–2919.
- Ramírez E, Sánchez-Maldonado C, Mayoral MA, Mendieta L, Alatríste V, Patricio-Martínez A, Limón ID. 2019. Neuroinflammation induced by the peptide amyloid- β (25–35) increase the presence of galectin-3 in astrocytes and microglia and impairs spatial memory. *Neuropeptides* **74**: 11–23.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC Del, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JFF, Khan ZUU, Ruano D, et al. 2006. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *NeurobiolAging* **27**: 1658–1672.
- Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD. 2016. Age, APOE and Sex: Triad of Risk of Alzheimer's Disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* **160**: 134.
- Ries M, Sastre M. 2016. Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci* **8**: 160.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**: 775–778.
- Rohan de Silva H., Jen A, Wickenden C, Jen L-S, Wilkinson SL, Patel AJ. 1997. Cell-specific expression of β -amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Mol Brain Res* **47**: 147–156.
- Sadleir KR, Kandalepas PC, Buggia-Prévot V, Nicholson DA, Thinakaran G, Vassar R. 2016. Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **132**: 1–22.
- Sakono M, Zako T. 2010. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J* **277**: 1348–1358.
- Salvadores N, Shahnawaz M, Scarpini E, Tagliavini F, Soto C. 2014. Detection of Misfolded A β Oligomers for Sensitive Biochemical Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Cell Rep* **7**: 261–268.
- Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Díaz C, Trujillo-Estrada L, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A. 2016. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol* **132**: 897–916.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez

- S, Ruano D, Vizuite M, et al. 2012. Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* **123**: 53–70.
- Sanchez-Mejias E. 2015. Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocámpal en la enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos. Tesis Doctoral.
- Sanchez-Mejias E, Nuñez-Díaz C, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon J, Fernandez-Valenzuela J, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, et al. 2019. Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients. *Brain Pathol.* 1–19.
- Sannerud R, Esselens C, Ejsmont P, Mattera R, Rochin L, Tharkeshwar AK, De Baets G, De Wever V, Habets R, Baert V, et al. 2016. Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool. *Cell* **166**: 193–208.
- Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu F-T. 2003. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* **112**: 389–97.
- Santos CY, Snyder PJ, Wu W-C, Zhang M, Echeverria A, Alber J. 2017. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimers Dement (Amst)* **7**: 69–87.
- Sarlus H, Heneka MT. 2017. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest* **127**: 3240–3249.
- Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, Hardy J, Vassar R, Winblad B, Saido TC. 2017. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J* **36**: 2473–2487.
- Savage JC, Picard K, González-Ibáñez F, Tremblay M-È. 2018. A Brief History of Microglial Ultrastructure: Distinctive Features, Phenotypes, and Functions Discovered Over the Past 60 Years by Electron Microscopy. *Front Immunol* **9**: 803.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. 2016. Alzheimer's disease. *Lancet* **388**: 505–517.
- Selkoe DJ, Hardy J. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**: 595–608.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**: a006189.
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Muzitansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Bacskai BJ, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT. 2012. Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**: 694–701.
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky R a, Frosch MP, Hyman BT. 2013. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**: 462–71.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, et al. 2008. Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat Med* **14**: 837.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**: 754–760.
- Shi Y, Holtzman DM. 2018. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nat Rev Immunol.* **18**: 759–772.
- Shukla AK, Spurrier J, Kuzina I, Giniger E. 2019. Hyperactive Innate Immunity Causes Degeneration of Dopamine Neurons upon Altering Activity of Cdk5. *Cell Rep* **26**: 131–

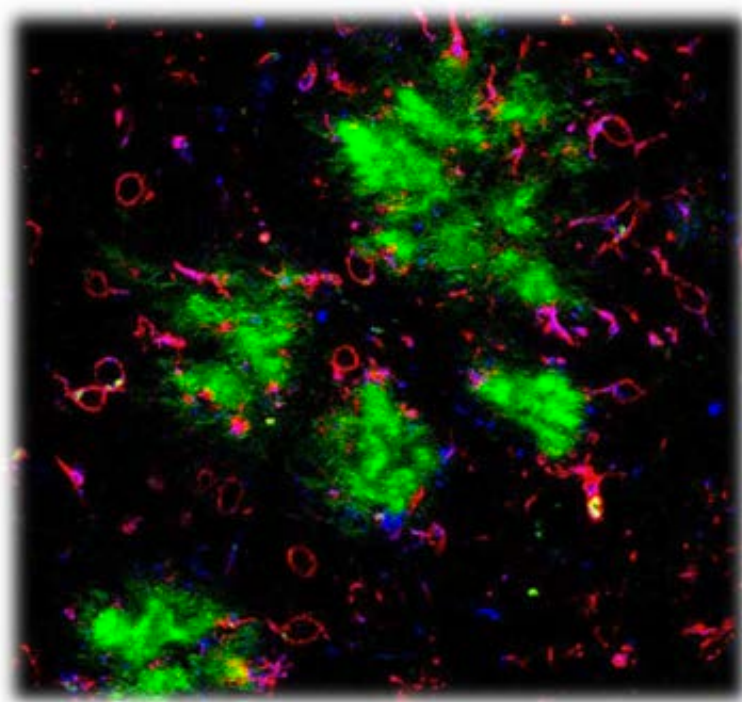
- 144.
- Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H. 2019. Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci* **42**: 778–792.
- Slot RER, Kester MI, Van Harten AC, Jongbloed W, Bouwman FH, Teunissen CE, Scheltens P, van der Flier WM, Veerhuis R. 2019. ApoE and clusterin CSF levels influence associations between APOE genotype and changes in CSF tau, but not CSF A β 42, levels in non-demented elderly. *Neurobiol Aging*. **79**: 101–109.
- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. 2017. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol* **54**: 8071–8089.
- Sokolova A, Hill MD, Rahimi F, Warden LA, Halliday GM, Shepherd CE. 2009. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Plays a Dominant Role in the Chronic Inflammation Observed in Alzheimer's Disease. *Brain Pathol* **19**: 392–398.
- Song WM, Colonna M. 2018. The Microglial Response to Neurodegenerative Disease. *Adv Immunol*. **139**: 1–50.
- Sosna J, Philipp S, Albay R, Reyes-Ruiz JM, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM, Glabe CG, Glabe CG. 2018. Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **13**: 11.
- Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA, Zhang Y, Spevak W, Lin J, Phan NY, et al. 2019. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun* **10**: 3758.
- Spangenberg EE, Green KN. 2017. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav Immun* **61**: 1–11.
- Spires-Jones TL, Hyman BT. 2014. The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. *Neuron* **82**: 756–771.
- Srinivasan K, Friedman BA, Etxeberria A, Huntley MA, Brug MP van der, Foreman O, Paw JS, Modrusan Z, Beach TG, Serrano GE, et al. 2019. Alzheimer's patient brain myeloid cells exhibit enhanced aging and unique transcriptional activation. *bioRxiv* 610345.
- Stancu I-C, Vasconcelos B, Ris L, Wang P, Villers A, Peeraer E, Buist A, Terwel D, Baatsen P, Oyelami T, et al. 2015. Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathol* **129**: 875–894.
- Stephan AH, Madison D V., Mateos JM, Fraser DA, Lovelett EA, Coutellier L, Kim L, Tsai H-H, Huang EJ, Rowitch DH, et al. 2013. A Dramatic Increase of C1q Protein in the CNS during Normal Aging. *J Neurosci* **33**: 13460.
- Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ. 1997. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* **48**: 626–632.
- Stratoulis V, Venero JL, Tremblay M, Joseph B. 2019. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J* **38**.
- Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I. 2009. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**: 475–485.
- Streit WJ, Xue Q-S, Tischer J, Bechmann I. 2014. Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 142.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1977–81.
- Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW,

- Zlokovic B V. 2018. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* **21**: 1318–1331.
- Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK. 2017. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int* **67**: 185–193.
- Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y. 2009. Gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci* **29**: 13042–52.
- Tao CC, Cheng KM, Ma YL, Hsu WL, Chen YC, Fuh JL, Lee WJ, Chao CC, Lee EHY. 2019. Galectin-3 promotes A β oligomerization and A β toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*.
- Tatarnikova OG, Orlov MA, Bobkova N V. 2015. Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochem* **80**: 1800–1819.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. 1991. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**: 572–580.
- Thinakaran G, Koo EH. 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* **283**: 29615–9.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JCC, Vizuete M, Gutierrez A, et al. 2012. Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *MolNeurodegener* **7**: 59.
- Trujillo-Estrada L, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, et al. 2014. Early Neuronal Loss and Axonal/Presynaptic Damage is Associated with Accelerated Amyloid-beta Accumulation in AbetaPP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum. *J Alzheimers Dis* **42**: 521–541.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De V C, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, et al. 2013. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta NeuropatholCommun* **1**: 73.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *ProgNeurobiol* **70**: 1–32.
- Ugbode C, Hu Y, Whalley B, Peers C, Rattray M, Dallas ML. 2017. Astrocytic transporters in Alzheimer's disease. *Biochem J* **474**: 333–355.
- Ulland TK, Colonna M. 2018. TREM2 — a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **14**: 667–675.
- Ulrich JD, Finn MB, Wang Y, Shen A, Mahan TE, Jiang H, Stewart FR, Piccio L, Colonna M, Holtzman DM. 2014. Altered microglial response to A β plaques in APPS1-21 mice heterozygous for TREM2. *Mol Neurodegener* **9**: 20.
- Ulrich JD, Ulland TK, Colonna M, Holtzman DM. 2017. Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease. *Neuron* **94**: 237–248.
- Ulrich JD, Ulland TK, Mahan TE, Nyström S, Nilsson KP, Song WM, Zhou Y, Reinartz M, Choi S, Jiang H, et al. 2018. ApoE facilitates the microglial response to amyloid plaque pathology. *J Exp Med* **215**: 1047–1058.
- Usenovic M, Niroomand S, Drolet RE, Yao L, Gaspar RC, Hatcher NG, Schachter J, Renger JJ, Parmentier-Batteur S. 2015. Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J Neurosci* **35**: 14234–14250.
- Van Dam D, De Deyn PP. 2011. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's

- disease. *Br J Pharmacol* **164**: 1285–1300.
- van Loenhoud AC, van der Flier WM, Wink AM, Dicks E, Groot C, Twisk J, Barkhof F, Scheltens P, Ossenkoppele R. 2019. Cognitive reserve and clinical progression in Alzheimer disease. *Neurology* **93**: e334–e346.
- Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, Vieira-Saecker A, Schwartz S, Santarelli F, Kummer MP, et al. 2017. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature* **552**: 355–361.
- Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. 2011. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol* **10**: 241–52.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* **98**: 239–389.
- Verkhatsky A, Parpura V. 2016. Astroglipathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis* **85**: 254–261.
- Verkhatsky A, Zorec R, Rodriguez JJ, Parpura V. 2016. Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* **26**: 74–79.
- Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, Kern S, Ousset P-J, Maruff P, Skoog I, et al. 2019. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's Dement* **15**: 888–898.
- Victoria GS, Zurzolo C. 2017. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol* **216**: 2633–2644.
- Viola KL, Klein WL. 2015. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* **129**: 183–206.
- Wahl D, Solon-Biet SM, Cogger VC, Fontana L, Simpson SJ, Le Couteur DG, Ribeiro R V. 2019. Aging, lifestyle and dementia. *Neurobiol Dis* **130**: 104481.
- Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2012. Abnormal hyperphosphorylation of tau: Sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Adv Alzheimer's Dis* **3**: 123–139.
- Wang W, Moerman-Herzog AM, Slaton A, Barger SW. 2017a. Presenilin 1 mutations influence processing and trafficking of the ApoE receptor apoER2. *Neurobiol Aging* **49**: 145–153.
- Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Krüger L, Irsen S, Tepper K, Chandupatla R, Maetzler W, Schneider A, Mandelkow E, et al. 2017b. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* **12**: 1–25.
- Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, Gilfillan S, Krishnan GM, Sudhakar S, Zinselmeyer BH, et al. 2015. TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model. *Cell* **160**: 1061–1071.
- Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, Yuan P, Mahan TE, Shi Y, Gilfillan S, et al. 2016. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med* **213**: 667–75.
- Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. 2019. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol Cell Biol* **imcb.12301**.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* **231**: 482–497.
- Woerman AL, Aoyagi A, Patel S, Kazmi SA, Lobach I, Grinberg LT, McKee AC, Seeley WW, Olson SH, Prusiner SB. 2016. Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy

- patients propagate in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E8187–E8196.
- Wolfe MS. 2008. Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **5**: 391–8.
- Wolfe MS. 2019a. Structure and Function of the γ -Secretase Complex. *Biochemistry* **58**: 2953–2966.
- Wolfe MS. 2019b. Substrate recognition and processing by γ -secretase. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 183016.
- Wolfe MS. 2013. Toward the structure of presenilin/ γ -secretase and presenilin homologs. *Biochim Biophys Acta* **1828**: 2886–97.
- Xiao Q, Yan P, Ma X, Liu H, Perez R, Zhu A, Gonzales E, Burchett JM, Schuler DR, Cirrito JR, et al. 2014. Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates abeta clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* **34**: 9607–9620.
- Yeh FL, Hansen D V., Sheng M. 2017. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med* **23**: 512–533.
- Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, Paul SM, Luo W, Colonna M, Baddeley D, Grutzendler J. 2016. TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron* **90**: 724–739.
- Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S-I, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y, Li R. 2005. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 19198–203.
- Yuksel M, Tacal O. 2019. Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: An up-to-date review. *Eur J Pharmacol* **856**: 172415.
- Zanjani H, Finch CE, Kemper C, Atkinson J, McKeel D, Morris JC, Price JL. 2005. Complement activation in very early Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **19**: 55–66.
- Zerbinatti C V, Wozniak DF, Cirrito J, Cam JA, Osaka H, Bales KR, Zhuo M, Paul SM, Holtzman DM, Bu G. 2004. Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1075–80.
- Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* **4**: 3.
- Zhao N, Liu C-C, Qiao W, Bu G. 2018a. Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* **83**: 347–357.
- Zhao Y, Wu X, Li X, Jiang LL, Gui X, Liu Y, Sun Y, Zhu B, Piña-Crespo JC, Zhang M, et al. 2018b. TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* **97**: 1023-1031.
- Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K, Winkler EA, Ramanathan A, Kanekiyo T, Bu G, et al. 2015. Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci* **18**: 978–87.
- Zlokovic B V. 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* **12**: 723–38.

8. Anexos




ANEXO 1

Sanchez-Mejias E*, Nuñez-Diaz C*, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Davila JC, Vitorica J and Gutierrez A. (2019). Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients. *Brain Pathology*. DOI: 10.1111/bpa.12785

* Ambos han contribuido igualmente como primeros autores

RESEARCH ARTICLE

Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients

Elisabeth Sanchez-Mejias^{1,2,*}; Cristina Nuñez-Díaz^{1,2,*}; Raquel Sanchez-Varo^{1,2};
 Angela Gomez-Arboledas^{1,2}; Juan Antonio Garcia-Leon^{1,2}; Juan Jose Fernandez-Valenzuela^{1,2};
 Marina Mejias-Ortega^{1,2}; Laura Trujillo-Estrada^{1,2}; David Baglietto-Vargas^{1,2}; Ines Moreno-Gonzalez^{1,2};
 Jose Carlos Davila^{1,2}; Javier Vitorica^{2,3,4,5}; Antonia Gutierrez^{1,2,5} 

¹ Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain.

² Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain.

³ Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

⁴ Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

Keywords

Alzheimer, GABA, human brain, interneuron, parvalbumin, somatostatin, transentorhinal cortex, transgenic mouse.

Abbreviations

Aβeta, amyloid-beta; AD, Alzheimer's disease; ANOVA, analysis of variance; DAB, diaminobenzidine tetrahydrochloride; GABA, gamma-aminobutyric acid; hAPP, human amyloid precursor protein; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; SOM, somatostatin; SD, standard deviation; PBS, phosphate-buffered saline; PV, parvalbumin; WT, wildtype.

Corresponding authors:

Antonia Gutierrez, PhD, Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga, Spain (email: agutierrez@uma.es)

Javier Vitorica, PhD, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Prof. Garcia Gonzalez 2, 41012 Sevilla, Spain (email: vitorica@us.es)

Received 9 June 2019

Accepted 2 September 2019

Published Online Article

Accepted 00 Month 2019

*Both contributed equally as first authors

[†]Co-senior authors

doi:10.1111/bpa.12785

Abstract

Neuronal loss is the best neuropathological substrate that correlates with cortical atrophy and dementia in Alzheimer's disease (AD). Defective GABAergic neuronal functions may lead to cortical network hyperactivity and aberrant neuronal oscillations and in consequence, generate a detrimental alteration in memory processes. In this study, using immunohistochemical and stereological approaches, we report that the two major and non-overlapping groups of inhibitory interneurons (SOM-cells and PV-cells) displayed distinct vulnerability in the perirhinal cortex of APP/PS1 mice and AD patients. SOM-positive neurons were notably sensitive and exhibited a dramatic decrease in the perirhinal cortex of 6-month-old transgenic mice (57% and 61% in areas 36 and 35, respectively) and, most importantly, in AD patients (91% in Braak V–VI cases). In addition, this interneuron degenerative process seems to occur in parallel, and closely related, with the progression of the amyloid pathology. However, the population expressing PV was unaffected in APP/PS1 mice while in AD brains suffered a pronounced and significant loss (69%). As a key component of cortico-hippocampal networks, the perirhinal cortex plays an important role in memory processes, especially in familiarity-based memory recognition. Therefore, disrupted functional connectivity of this cortical region, as a result of the early SOM and PV neurodegeneration, might contribute to the altered brain rhythms and cognitive failures observed in the initial clinical phase of AD patients. Finally, these findings highlight the failure of amyloidogenic AD models to fully recapitulate the selective neuronal degeneration occurring in humans.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by cognitive deficits that are correlated with aberrant neuronal network activity, which might relate to dysfunction of GABAergic neurons


(2, 60). Inhibitory signal plays a fundamental role in the generation of cerebral rhythmic oscillations, so a defective inhibition, because of the loss or low activity of GABAergic interneurons, can lead to networks abnormalities. Impaired inhibition has been proposed as a potential mechanism of

ANEXO 2

Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L, Fernandez-Valenzuela JJ, Vizuite M, Comella JX, Galea E, Vitorica J and Gutierrez A. (2017). Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia*. DOI: 10.1002/glia.23270

RESEARCH ARTICLE

Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease

Angela Gomez-Arboledas^{1,3} | Jose C. Davila^{1,3} | Elisabeth Sanchez-Mejias^{1,3} |
Victoria Navarro^{2,3,4} | Cristina Nuñez-Diaz^{1,3} | Raquel Sanchez-Varo^{1,3} |
Maria Virtudes Sanchez-Mico^{2,3,4} | Laura Trujillo-Estrada^{1,3} |
Juan Jose Fernandez-Valenzuela^{1,3} | Marisa Vizueté^{2,3,4} | Joan X. Comella^{3,5,7} |
Elena Galea^{5,6} | Javier Vitorica^{2,3,4*} | Antonia Gutierrez^{1,3*} 

¹Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Spain

²Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

⁴Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain

⁵Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁶ICREA, Pg. Lluís Companys 23, Barcelona, 08010, Spain

⁷Institut de Recerca de l'Hospital Unversitari de la Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Spain

Correspondence

Antonia Gutierrez, Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, Málaga 29071, Spain.
Email: agutierrez@uma.es
Javier Vitorica, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/Prof. García González 2, Sevilla 41012, Spain.
Email: vitorica@us.es

Funding information

La Marató-TV3 Foundation, Grant Numbers 20141432 (AG), 20141431 (JV), 20141433 (JXC), 20141430 (EG); Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) of Spain co-financed by FEDER funds from European Union, Grant Numbers PI15/00796 (AG) and PI15/00957 (JV); CIBERNED, Grant Number PI2015-2/02 (AG, JV, JXC); Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia, Grant Number CTS-2035 (JV, AG)

Abstract

Reactive astrogliosis, a complex process characterized by cell hypertrophy and upregulation of components of intermediate filaments, is a common feature in brains of Alzheimer's patients. Reactive astrocytes are found in close association with neuritic plaques; however, the precise role of these glial cells in disease pathogenesis is unknown. In this study, using immunohistochemical techniques and light and electron microscopy, we report that plaque-associated reactive astrocytes envelop, engulf and may digest presynaptic dystrophies in the hippocampus of amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/PS1) mice. Microglia, the brain phagocytic population, was apparently not engaged in this clearance. Phagocytic reactive astrocytes were present in 35% and 67% of amyloid plaques at 6 and 12 months of age, respectively. The proportion of engulfed dystrophic neurites was low, around 7% of total dystrophies around plaques at both ages. This fact, along with the accumulation of dystrophic neurites during disease course, suggests that the efficiency of the astrocyte phagocytic process might be limited or impaired. Reactive astrocytes surrounding and engulfing dystrophic neurites were also detected in the hippocampus of Alzheimer's patients by confocal and ultrastructural analysis. We posit that the phagocytic activity of reactive astrocytes might contribute to clear dysfunctional synapses or synaptic debris, thereby restoring impaired neural circuits and reducing the inflammatory impact of damaged neuronal parts and/or limiting the amyloid pathology. Therefore, potentiation of the phagocytic properties of reactive astrocytes may represent a potential therapy in Alzheimer's disease.

*Co-senior corresponding authors

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2017 The Authors. GLIA Published by Wiley Periodicals, Inc.

ANEXO 3

Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico MV, Sanchez-Varo R, Nuñez-Diaz C, Trujillo-Estrada L, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A and Vitorica J. (2016). Soluble phosphor-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathologica*. DOI: 10.1007/s00401-016-1630-5

Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration

Elisabeth Sanchez-Mejias^{1,4} · Victoria Navarro^{2,3,4} · Sebastian Jimenez^{2,3,4} · Maria Sanchez-Mico^{2,3,4} · Raquel Sanchez-Varo^{1,4} · Cristina Nuñez-Diaz^{1,4} · Laura Trujillo-Estrada^{1,4} · Jose Carlos Davila^{1,4} · Marisa Vizueté^{2,3,4} · Antonia Gutierrez^{1,4} · Javier Vitorica^{2,3,4}

Received: 28 July 2016 / Revised: 5 October 2016 / Accepted: 5 October 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The role of microglial cells in the development and progression of Alzheimer's disease (AD) has not been elucidated. Here, we demonstrated the existence of a weak microglial response in human AD hippocampus which is in contrast to the massive microglial activation observed in APP-based models. Most importantly, microglial cells displayed a prominent degenerative profile (dentate gyrus > CA3 > CA1 > parahippocampal gyrus), including fragmented and dystrophic processes with spheroids, a reduced numerical density, and a significant decrease in the area of surveillance ("microglial domain"). Consequently, there was a substantial decline in the

area covered by microglia which may compromise immune protection and, therefore, neuronal survival. In vitro experiments demonstrated that soluble fractions (extracellular/cytosolic) from AD hippocampi were toxic for microglial cells. This toxicity was abolished by AT8 and/or AT100 immunodepletion, validating that soluble phospho-tau was the toxic agent. These results were reproduced using soluble fractions from phospho-tau-positive Thy-tau22 hippocampi. Cultured microglial cells were not viable following phagocytosis of SH-SY5Y cells expressing soluble intracellular phospho-tau. Because the phagocytic capacity of microglial cells is highly induced by apoptotic signals in the affected neurons, we postulate that accumulation of intraneuronal soluble phospho-tau might trigger microglial degeneration in the AD hippocampus. This microglial vulnerability in AD pathology provides new insights into the immunological mechanisms underlying the disease progression and highlights the need to improve or develop new animal models, as the current models do not mimic the microglial pathology observed in the hippocampus of AD patients.

Elisabeth Sanchez-Mejias and Victoria Navarro contributed equally to this work. Antonia Gutierrez and Javier Vitorica are co-senior authors.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-016-1630-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Javier Vitorica
vitorica@us.es

Antonia Gutierrez
agutierrez@uma.es

Keywords Alzheimer · Microglia · Pathology · Human brain · Hippocampus

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is so far an incurable, progressive degenerative brain disorder characterized by the presence of extracellular amyloid-beta (Aβeta) plaques and intracellular aggregated phosphorylated tau, together with synaptic and neuronal cell loss. Neuroinflammation has been postulated to be a critical factor in the pathogenesis of AD [16, 17, 19]. The microglial activation process is characterized by remarkable morphological changes (larger cell

- ¹ Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain
- ² Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain
- ³ Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, C/Prof. García González 2, 41012 Sevilla, Spain
- ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

ANEXO 4

Núñez-Díaz C, Vitorica J and Gutierrez A. (2018). Toxicidad de las placas amiloides y su impacto en la progression de la enfermedad de Alzheimer. *Libro de actas del Workshop Internacional: Metabolic Reprograming as a Target for Cancer and Other Diseases*.

Toxicidad de las placas amiloides y su impacto en la progresión de la enfermedad de Alzheimer



Cristina Núñez-Díaz,^{a, b} Javier Vitorica,^{b, c, d} Antonia Gutiérrez^{a, b}

^a Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga. Málaga, España.

^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, España.

^c Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

^d Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, CSIC, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Resumen

La formación de depósitos extracelulares de beta-amiloide (A β) y la activación glial constituyen dos de los principales eventos patológicos en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (AD). A β se considera el agente causal de la enfermedad, ya que la acumulación de esta proteína comienza muchos años antes de que aparezcan los primeros síntomas. Los monómeros de A β se agregan, dando lugar a formas oligoméricas solubles, oligómeros prefibrilares y fibrilares, que finalmente dan lugar a las placas amiloides o seniles. El péptido A β se propaga entre regiones cerebrales conectadas sinápticamente durante la progresión de la patología, y desencadena la cascada de alteraciones características de la enfermedad: placas seniles, ovillos neurofibrilares, activación glial, pérdida sináptica y muerte neuronal. Aunque las placas de A β no correlacionan bien con el deterioro cognitivo de los pacientes, sí existe una alta correlación entre los niveles de oligómeros solubles y el grado de demencia. La acumulación del péptido A β atrae a las células microgliales y astrogliales, que se activan en torno a las placas, aunque la función de estas células activadas aún está por determinar. La hipótesis de este trabajo propone que las placas de A β podrían actuar como reservorio de oligómeros solubles de A β y que la glía reactiva que rodea a las placas regularía la toxicidad de éstas, favoreciendo la captación de oligómeros tóxicos hacia las placas, su compactación y su aislamiento del resto del parénquima cerebral. Una respuesta deficiente de la glía reactiva, podría llevar a una liberación de oligómeros tóxicos desde las placas, causando daño sináptico y muerte neuronal, contribuyendo por tanto a la progresión de la patología. La modulación de las propiedades tóxicas de las placas amiloides podría ser una estrategia terapéutica novedosa para modificar el curso de la enfermedad de Alzheimer.

